肺癌患者末稍血リンパ球の抗腫瘍活性の誘導に関する研究ー特に自己腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性についてー

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: 吉田, 政之 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8220

金沢大学十全医学会雑誌　第99巻　第5号　815－826（1990）

肺癌患者末梢血リンパ球の抗腫瘍活性の誘導に関する研究

－特に自己腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性について－

金沢大学医学部外科学第一講座（主任：岩　喬教授）
吉　田　政　之

（平成2年9月17日受付）

肺癌患者における末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocyte, PBL) の自己腫瘍細胞に対する免疫学的抗腫瘍活性の様相を，ナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞活性およびリコンビナントインターロイキン2 (recombinant interleukin 2, rIL-2) 刺激，OK-432 (IL-2 誘導物質) 刺激あるいは自己リンパ球腫瘍細胞混合培養 (autologous mixed lymphocytes tumor cell culture, autologous MLTC) で誘導される細胞傷害活性，モノクローナル抗体によるリンパ球亜群の分類などを指標として検討した。また，養子免疫療法 (adoptive immunotherapy, AIT) の実験的モデルとして，鶏卵法を用いて自己リンパ球より誘導したリンホカイン活性化キラー (lymphokine activated killer, LAK) 細胞の自己腫瘍組織に対する抗腫瘍活性を検討した．PBL を単独で培養しても，NK 抵抗性のヒト肺癌培養株細胞や自己腫瘍細胞に対する細胞傷害活性は認められず，PBL 自体による抗腫瘍活性は極めて低いと考えられた．しかし，PBL を rIL-2 や OK-432 存在下で7日間培養すると，K562 に対する細胞傷害活性が増強されるとともに，ヒト肺癌培養株細胞や自己腫瘍細胞に対しても著明な細胞傷害性が誘導された．さらに，PBL を rIL-2 とマイトマイシンC (mitomycin C, MMC) 処理した自己腫瘍細胞存在下で7日間培養すると，自己腫瘍細胞に対して最も高い細胞傷害活性を示すエフェクター細胞が誘導された．自己腫瘍細胞に対しても細胞傷害性を有するこれらのエフェクター細胞のリンパ球亜群を培養前と比較すると，$CD3^+$，$CD8^+$細胞が増加するのに対し，$CD4^+$，$CD16^+$細胞の減少が認められた．受精鶏卵の漿尿膜上に移植された自己腫瘍組織に対する自己リンパ球より誘導したエフェクター細胞の抗腫瘍活性を肺癌患者10例で検討した．10例中5例において無添加培養リンパ球注入例と比較し，LAK 細胞注入例で高い腫瘍阻止率を認めた．また，注入する LAK 細胞数を増加させることによって腫瘍阻止率も増加した．以上の成績から，試験管内で各種の生物学的反応変調物質 (biological response modifier, BRM) を使って誘導されたエフェクター細胞の肺癌患者に対する免疫療法の有用性が示唆された．

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

肺癌は近年著しく増加の傾向にあり[1]，その予後も不良である．その要因のひとつとして，一般に肺癌患者では宿主の免疫能が他臓器癌患者と比較して著しく低下していることが挙げられ[2]，そのために潜在的に全身性転移を生じ易く，その結果，遠隔成績を不良にしている[3]．特異的，あるいは各種の生物学的反応変調物質 (biological response modifier, BRM) を用いて，非特異的に宿主の免疫機能を賦活することによって，肺癌の進展を防止しようとする，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[4]．特に最近は，インターロイキン2 (interleukin 2, IL-2) を用いた養子免疫療法も注目され，一部臨床応用されうる段階に到達している[5]．

このような背景の中で，賦活されたリンパ球の自己

Abbreviations: AIT, adoptive immunotherapy; autologous MLTC, autologous mixed lymphocytes tumor cell culture; BRM, biological response modifier; CTL, cytotoxic T lymphocyte; FCS, fetal calf serum; IL-2, interleukin 2; LAK, lymphokine activated

腫瘍に対する抗腫瘍性を把握することは，免疫療法を施行する上できわめて重要である。本研究では，リコンビナントインターロイキン2 (recombinant IL-2, rIL-2) により誘導されるリンホカイン活性化キラー (lymphokine activated killer, LAK) 細胞や OK-432 で誘導される OK-LAK 細胞および rIL-2 と自己腫瘍細胞の混合培養で誘導される細胞傷害性Tリンパ球 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) の自己腫瘍細胞に対する細胞傷害活性，リンパ球亜群について比較検討し，さらに LAK 細胞を用いた養子免疫療法の実験モデルとして，鶏卵法を用いて自己リンパ球より誘導した LAK 細胞の自己腫瘍組織に対する抗腫瘍性についても検討を加えた．

対象および方法

I．対　象

1988年2月より1989年3月までに金沢大学第一外科に入院し，病理組織学的に肺癌と診断された症例のうち51例を対象とし，その末梢血および切除材料を用いた．内訳は，男性44例，女性7例で，年齢は41～79歳 (平均63.6歳) であった．病理組織型は，扁平上皮癌19例，腺癌23例，巨細胞癌4例，大細胞癌2例，小細胞癌3例であり，病期分類は，肺癌取扱い規約 (1987) による TNM 分類[9] によった．

II．リンパ球の分離と浮遊液の調整

末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocytes, PBL) の分離は Ficoll-Hypaque 比重遠心法により行った．早朝空腹時の患者から採血したヘパリン加末梢血 20～30ml を，0.1Mリン酸緩衝生理的食塩水 (pH 7.4) (phosphate buffered saline, PBS) で2倍に希釈し，Ficoll-Hypaque 液 (比重1.077) (Lymphoprep, Nyegaard, Oslo, Norway) 上に静かに重層させ，400×g で20分間遠心後，中間層を採取し，ペニシリン 200U/ml，ゲンタマイシン10μg/ml を添加した RPMI-1640 液 (Gibco, Gran Island, New York, U.S.A.) で3回洗浄し，単核球を分離した，次いで，直径 6cm のプラスチックシャーレ (Falcon, Oxnard, California, U.S.A.) に RPMI-1640 液をうすく敷き，その上に単核球浮遊液を散布し，37℃，5％ CO_2下で1時間静置後，上清液を採取してプラスチック付着細胞を除去した．非付着細胞浮遊液を 200×g で5分間遠心した後，その沈渣を非働化した牛胎児血清 (heat-inactivated fetal calf serum, FCS) (Gibco) を10％濃度に加えた RPMI-1640 液に浮遊させた．

III．自己腫瘍細胞の分離および組織培養

肺癌切除材料より採取した原発腫瘍組織あるいは転移陽性リンパ節を10％ FCS 添加 RPMI-1640 液中で壊死組織を除去し，眼科用尖刀にて 1mm 程度にまで細切した．これを1％コラゲナーゼ (Sigma, St. Louis, Missouri, U.S.A.) および0.02％ DNase (Sigma) を含む Hanks 液 10ml 中にて37℃で30分間インキュベートし，RPMI-1640 液で3回洗浄した後，金属メッシュ (NBC 工業，大阪) で濾過し，10％ FCS 添加 RPMI-1640 液を用いた単層培養系で増殖させた．通常，1～2週間で自家肺癌細胞は単層を形成し，Trypsin-EDTA (Gibco) 処理にて細胞浮遊液にしたものを標的細胞および自己リンパ球腫瘍細胞混合培養 (autologous mixed lymphocytes tumor cell culture, autologous MLTC) に用いた．

IV．ナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞活性の測定

Ficoll-Hypaque 比重遠心法により分離したリンパ球を10％ FCS 添加 RPMI-1640 液で 4×10^6 cells/ml に調整し，その100μl 宛を96穴平底型マイクロプレート (Falcon) の各穴に分注し，エフェクター細胞とした．一方，標的細胞として試験管内 (in vitro) で継代培養したヒト赤白血病細胞由来の K562 を用いた．4×10^6 cells/ml 濃度の K562 細胞浮遊液 1ml に，100μ Ci の $Na_2{}^{51}CrO_4$ (100μl) (New England Nuclear, Boston, Massachusetts, U.S.A) を加え，37℃，5％ CO_2下で1時間インキュベートした後，RPMI-1640 液で3回洗浄し，10％ FCS 添加 RPMI-1640 液に浮遊させたものを ^{51}Cr 標識 K562 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 K562 細胞浮遊液 100μl を前述のエフェクター細胞液100μl に加えた (この条件でエフェクター細胞と標的細胞は40：1の比率となる)．37℃，5％ CO_2下で4時間インキュベートした後，上清を各穴から 100μl 宛採取し，上清中の ^{51}Cr 放出量をオートウェルガンマーカウンター ARC-501 (アロカ，東京) にて測定した．下記の算定式に基づき特異的 ^{51}Cr 放出量を算出して，これを NK 細胞活性値とした．

$$\text{特異的 } ^{51}\text{Cr 放出量 (\%)} = \frac{\text{試験放出量 (cpm)} - \text{自然放出量 (cpm)}}{\text{最大放出量 (cpm)} - \text{自然放出量 (cpm)}} \times 100$$

killer; NK, natural killer; PBL, peripheral blood lymphocyte; PBS, phosphate buffered saline; rIL-2, recombinant interleukin 2

最大放出量は標的細胞からの最大の ^{51}Cr 放出量で，標的細胞に 0.1N HCl 100μl を加えた時の ^{51}Cr 放出量を示し，自然放出量は10% FCS 添加 RPMI-1640 液 100μl を加えてインキュベートした時の標的細胞の ^{51}Cr 放出量である．

V．各種培養リンパ球の細胞傷害性の測定

1．末梢血リンパ球単独培養による細胞傷害性の測定

4×10^6/ml 濃度のリンパ球浮遊液 0.4ml に10% FCS 添加 RPMI-1640 液0.6ml を添加し，37°C，5% CO_2下で7日間培養した．K562，PC-3 (NK 抵抗性のヒト肺腺癌由来培養細胞株)，PC-10 (NK 抵抗性のヒト肺扁平上皮癌由来培養細胞株)，自己腫瘍細胞を標的細胞とし，培養リンパ球による細胞傷害性を測定した．PC-3 と PC-10 の選択は病理組織型検索結果に基づいた．細胞傷害性の測定は，NK 細胞活性の測定と同様の方法を用いて行った．

2．rIL-2 の添加培養による細胞傷害性の測定

4×10^6/ml 濃度のリンパ球浮遊液 0.4ml に 20U/ml 濃度の rIL-2 (塩野義製薬，大阪) 0.6ml を添加し，37°C，5% CO_2下で7日間培養したリンパ球をエフェクター細胞とし，同様に細胞傷害性を測定した．標的細胞も同様に，K562，PC-3，PC-10，自己腫瘍細胞を用いた．

3．OK-432 の添加培養による細胞傷害性の測定

4×10^6/ml 濃度のリンパ球浮遊液 0.4ml に 5Klinische Einheit/ml 濃度の OK-432 (中外製薬，東京) 0.1ml と10% FCS 添加 RPMI-1640 液0.5ml を添加し，37°C，5% CO_2下で7日間培養したリンパ球をエフェクター細胞とし，同様に細胞傷害性を測定した．標的細胞も同様に，K562，PC-3，PC-10，自己腫瘍細胞を用いた．

4．自己リンパ球・腫瘍細胞混合培養による細胞傷害性の測定

Trypsin-EDTA 処理し，1×10^6 cells/ml に調整した自己腫瘍細胞浮遊液 1ml と 50μg/ml 濃度のマイトマイシンCを37°C，5% CO_2下で30分間培養し，RPMI-1640 液で3回洗浄した後，20U/ml 濃度の rIL-2 を含む10% FCS 添加 RPMI-1640 液 1ml に浮遊させ，マイトマイシンC処理自己腫瘍細胞を作成した．4×10^6/ml 濃度のリンパ球浮遊液0.4ml にマイトマイシンC処理自己腫瘍細胞浮遊液0.6ml を添加し，37°C，5% CO_2下で7日間培養したリンパ球 (この条件でリンパ球と腫瘍細胞は8：3の比率となる) をエフェクター細胞とし，同様に細胞傷害性を測定した．標的細胞も同様に，K562，PC-3，PC-10，自己腫瘍細胞を用いた．

VI．鶏卵法 (chick embryo assay) による LAK 細胞の抗腫瘍活性の測定

孵卵10日目の鶏卵を光にて透見し，漿尿膜上の血管の位置を定めて回転式のヤスリを用いて約 1cm² の大きさに卵殻を開窓した．直下にある漿尿膜に傷をつけないように露出した卵殻膜に小さな傷をつけ，気室中央の卵殻に小孔を開け，その小孔より気室の空気を弱く吸引して卵殻膜と漿尿膜とを剝離した後，卵殻膜を除去して人工気室を作成した．この露出した漿尿膜上の血管の発達したところに，移植位置の保持と細胞の拡散を防止する目的で，直径 8mm のテフロンリングを置いて細切した自己腫瘍組織を移植した．腫瘍移植3日目に再び光にて透見し漿尿膜上の血管の位置を定め卵殻膜を露出し，流動パラフィンを滴下した。以上の操作により透見可能となった漿尿膜上の血管内に30ゲージ針のついた注射器を用いて LAK 細胞を注入した．LAK 細胞は末梢血より分離したリンパ球浮遊液を 20U/ml 濃度の rIL-2 を含む10% FCS 添加 RPMI-1640 液中で，37°C，5% CO_2下で7日間培養したリンパ球を用いた．移植7日目に漿尿膜上に成育した腫瘍の重量を測定し，対照群と比較し腫瘍阻止率 (tumor inhibition ratio) を算出した．

$$\text{腫瘍阻止率 (\%)} = \left(1-\frac{\text{処置群の平均腫瘍重量 (mg)}}{\text{対照群の平均腫瘍重量 (mg)}}\right)\times100$$

なお，血管内に生理的食塩水を注入したものを対照群とし，原則として1群6個の受精鶏卵を使用し，平均値を算出して評価した．

VII．モノクローナ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ーナル抗体を用い，肺癌患者からの培養前および培養後の PBL についてリンパ球亜群を測定した．3～5×10^6 cells/ml に調整したリンパ球浮遊液 100μl にモノクローナル抗体10μl を加え，4°C，30分間静置した．これに PBS 1ml 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，U.S.A.) によって蛍光陽性細胞を測定した．使用モノクローナル抗体は，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 Leu-4 (CD3)，ヘルパー/インデューサーT細胞に反応性の Leu-3a (CD4)，サプレッサー/細胞傷害性T細胞に反応性の Leu-2a (CD8)，NK 細胞に反応性の Leu-7 (CD57)，NK 細胞および好中球に反応性の Leu-11 (CD16) (Beckton-Dickinson，Mountain View，

California, U.S.A.) を用いた．また，rIL-2, OK-432 または自己腫瘍細胞を添加培養した PBL についても同様にリンパ球亜群を測定した．

Ⅷ．測定値の有意差検定

細胞傷害活性の測定値は，平均値±標準偏差 (mean±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，対応のある標本の t 検定を用い，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．肺癌腫瘍の初代培養

肺癌手術例30例に対し，切除材料より採取した原発巣あるいは転移陽性リンパ節を用いて組織培養を行った．通常肺癌細胞は，1～2週で単層シート状に増殖し，島状あるいは敷石状に上皮細胞が集団を形成していたが，2週目を過ぎると線維芽細胞の増殖が旺盛になり，上皮細胞の周辺に観察された (図1)．培養成功例は22例 (73.3%) で，内訳は扁平上皮癌8例 (72.7%)，腺癌9例 (75.0%)，巨細胞癌3例 (100.0%)，大細胞癌1例 (50.0%)，小細胞癌1例 (50.0%) であり (表1)，不成功例の主たる原因は混合感染であった．

Ⅱ．K562，培養肺癌細胞株，自己腫瘍細胞に対する無添加培養リンパ球の細胞傷害活性の比較

肺癌患者10例の末梢血リンパ球を無添加の培養液中で7日間培養し，K562, PC-3 または PC-10，自己腫瘍細胞に対する傷害活性を培養前，培養3日目，7日目に測定した．無添加培養リンパ球の K562 に対する傷害活性は常に30%以上を示したが，7日間の培養でも傷害活性の増強は認められなかった．一方，培養肺癌細胞株，自己腫瘍細胞に対する細胞傷害活性は微弱であり，0，3，7日目いずれにおいても K562 に対する活性と比較し有意に ($p<0.01$) 低値を示した (図2)．

Ⅲ．各種 BRM 添加培養リンパ球の検討

肺癌患者15例の末梢血リンパ球に rIL-2, OK-432 および rIL-2 と自己腫瘍細胞を添加してそれぞれ7日間培養し，リンパ球数と各種標的細胞に対する傷害活性を比較した．

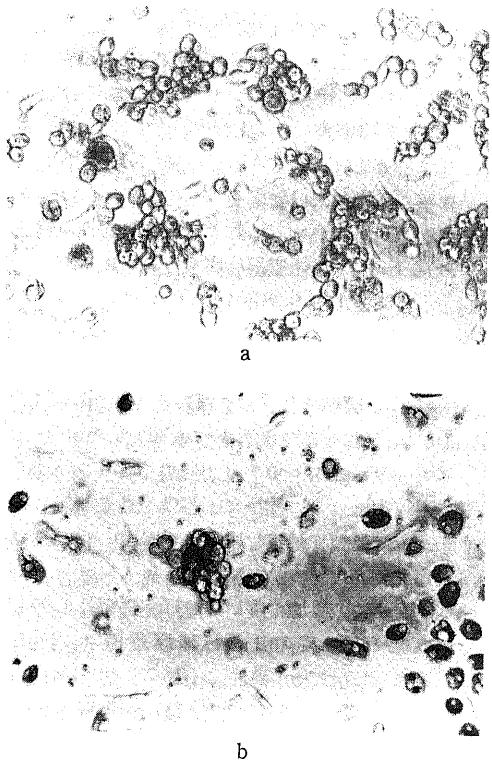

Fig. 1. Microscopical findings of cultured tumor cells. a, Cultured adenocarcinoma cells showing cobblestone-like appearance at 7 days of culture (×200 by phase contrast microscope); b, Cultured squamous cell carcinoma cells at 7 days of culture (×200 by phase contrast microscope).

Table 1. Primary tissue culture of various cell types

Cell type	No.of tumors tested	No.of tumors cultured	Culture positive ratio (%)
Epidermoid carcinoma	11	8	72.7
Adenocarcinoma	12	9	75.0
Giant cell carcinoma	3	3	100.0
Large cell carcinoma	2	1	50.0
Small cell carcinoma	2	1	50.0
Total	30	22	73.3

The tissue specimens from primary sites or metastatic lymph nodes of lung cancer patients were cultured.

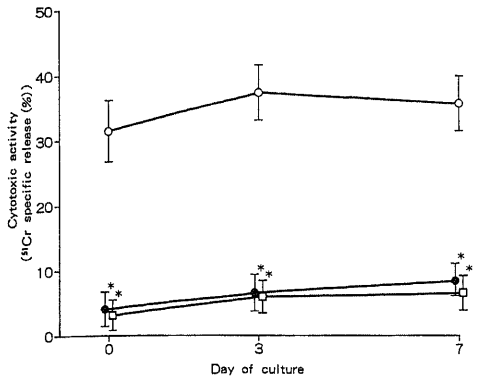

Fig. 2. Comparison of cytotoxic activity of PBL against various target cells. PBL (1.6×10^6 cells) were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and tested for lysis of K562 (○), PC-3 or PC-10 (●) and autologous tumor (□) cells at 0, 3 and 7 days of culture period. Test was performed in ^{51}Cr specific release assay. Data are shown as mean±S.D. *, $p<0.01$ vs. K562 group by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison.

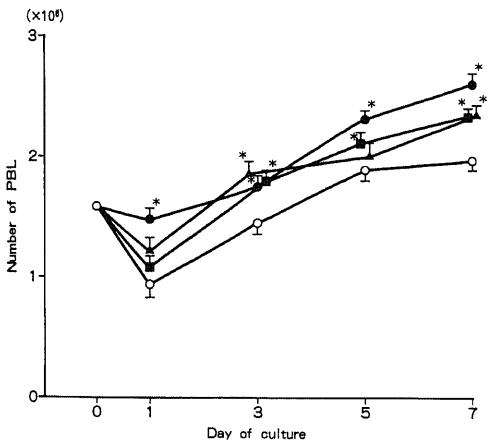

Fig. 3. Changes in the number of PBL with culture condition. PBL (1.6×10^6 cells) were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and counted for number at 1, 3, 5 and 7 day of culture period. Data are shown as mean±S.D.. ○, no addition; ●, with rIL-2 (20 U/ml); ■, with OK-432(0.5 KE/ml); ▲, with rIL-2 (20 U/ml) and autologous tumor cells. *, $p<0.01$ vs. no addition group by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison.

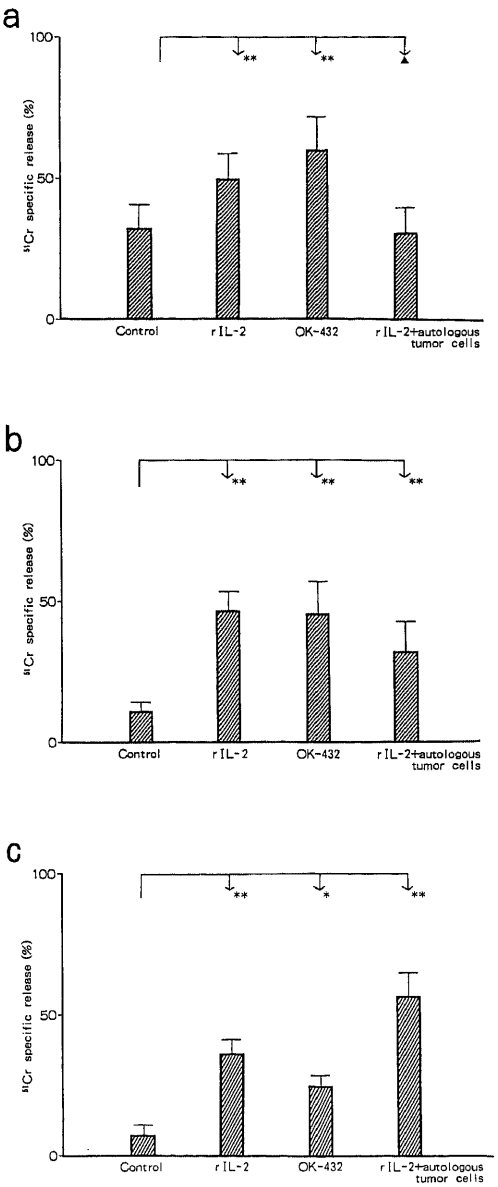

Fig. 4. Kinetics of cytotoxic activity of PBL stimulated with rIL-2, OK-432 or rIL-2 plus autologous tumor cells against K562 (a), PC-3 or PC-10 (b) and autologous tumor (c) cells. PBL (1.6×10^6 cells) were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and rIL-2, OK-432 or rIL-2 and autologous tumor cells, and tested for lysis of K562, PC-3 or PC-10 and autologous tumor cells at 7 days of culture period. Test was performed in ^{51}Cr specific release assay. Data are shown as mean±S.D.. ▲, N.S.; *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ vs. control by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison.

1．培養後のリンパ球数の変化

培養リンパ球数は，いずれの群においても培養開始後1日目に減少するが，その後7日目まで徐々に増加した．1.6×10^6の細胞数で培養を開始し，7日目には無添加群（平均1.88×10^6）に対し，rIL-2 添加群（平均2.55×10^6），OK-432 添加群（平均2.27×10^6），rIL-2 と自己腫瘍細胞添加群（平均2.34×10^6）では有意に（$p<0.01$）リンパ球数が増加した（図3）．

2．各標的細胞に対する細胞傷害活性の増強

K562 細胞を標的細胞とした場合の傷害活性は，無添加群で32.3±8.7%，rIL-2 添加群で49.7±9.2%，OK-432 添加群で60.1±11.6%，rIL-2 と自己腫瘍細胞添加群で30.7±9.3%であった．無添加群と比較し rIL-2 添加群，OK-432 添加群において傷害活性は有意に（$p<0.01$）増強された（図4a）．

PC-3 細胞または PC-10 細胞を標的細胞とした場合の傷害活性は，無添加群（11.4±2.8%）ではほとんど傷害活性を認めなかったのに対し，rIL-2 添加群（46.6±6.9%），OK-432 添加群（46.2±11.1%），rIL-2 と自己腫瘍細胞添加群（32.9±10.7%）では有意に（$p<0.01$）増強された（図4b）．

自己腫瘍細胞に対する傷害活性も，無添加群（8.8±2.8%）ではほとんど傷害活性を認めなかったのに対し，添加群ではいずれも著明に増強された．特に，rIL-2 と自己腫瘍細胞添加群では57.4±8.5%と最も高い傷害活性を示した（図4c）．

Ⅳ．各種 BRM 添加培養リンパ球のリンパ球亜群の変化

リンパ球亜群を，培養前，無添加培養，rIL-2 添加培養，OK-432 添加培養，rIL-2 と自己腫瘍細胞添加培養の5群について検討した（表2）．無添加培養では，培養前と比較し各モノクローナル抗体陽性細胞の割合に差はなかった．rIL-2 添加培養では，$CD3^+$（末梢血T細胞に反応性），$CD8^+$（サプレッサー/細胞傷害性T細胞に反応性）細胞が有意に（$p<0.01$）増加し，$CD4^+$（ヘルパー/インデューサーT細胞に反応性），$CD16^+$（NK 細胞および好中球に反応性）細胞が有意に（$p<0.01$）減少した．OK-432 添加培養および rIL-2 と自己腫瘍細胞添加培養でも，ほぼ同様の傾向がみられ，$CD3^+$，$CD8^+$ 細胞が有意に（$p<0.01$）増加し，$CD57^+$（NK 細胞に反応性），$CD16^+$ 細胞が有意に（$p<0.01$）減少した．

Ⅴ．鶏卵法による LAK 細胞の抗腫瘍活性の測定

肺癌患者10例（腺癌5例，扁平上皮癌3例，大細胞癌1例，小細胞癌1例）の切除材料より採取した腫瘍組織を用いて，LAK 細胞の生体内（in vivo）における抗腫瘍活性を鶏卵法により検討した．手術の5日前に肺癌患者の末梢血よりリンパ球を分離して rIL-2 と共に7日間培養を行い LAK 細胞を作製した．前述の腫瘍を細切して孵卵10日目の受精鶏卵漿尿膜上に移植し，移植後3日目に作製した LAK 細胞を $1\sim3\times10^6$ 個漿尿膜上の血管内に投与した．投与後4日目に成育した腫瘍を摘出して抗腫瘍効果を判定した．

rIL-2 を加えずに培養したリンパ球（正常 PBL）を投与した群に対して LAK 細胞を投与した群では，10例中5例により高い抗腫瘍効果が認められ，2例に効果なく，3例に LAK 細胞の投与により腫瘍が増大する結果が得られた（表3）．一方，症例数は3例と少ないが，投与する LAK 細胞数を変えると細胞数に依存して抗腫瘍効果の増強が認められた（図5）．この実験事実は，LAK 細胞の抗腫瘍効果の発現にはエフェクター細胞と標的細胞の比率が重要であることを示唆し

Table 2. Changes in phenotype of PBL stimulated by rIL-2, OK-432 or rIL-2 plus autologous tumor cells

Group (n=7)	Ratio (%) of PBL positive in reaction to monoclonal antibody				
	Leu-4 (CD3)	Leu-3a (CD4)	Leu-2a (CD8)	Leu-7 (CD57)	Leu-11 (CD16)
Preincubation	53.3±4.5	33.2±2.9	22.6±3.7	21.7±4.1	14.1±3.1
No addition	58.6±7.7	36.4±9.3	26.4±4.7	21.6±6.9	14.0±1.6
With rIL-2	70.4±7.8*	27.0±4.5*	47.0±8.2*	27.9±3.8	8.1±2.7*
With OK-432	61.2±5.8*	32.7±3.1	32.6±6.2*	17.4±4.3*	8.7±3.6*
With rIL-2 plus autologous tumor cells	74.9±6.3*	31.7±6.7	47.6±8.7*	13.3±2.7*	6.0±2.6*

PBL (1.6×10^6 cells) were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and rIL-2, OK-432 or rIL-2 plus autologous tumor cells. Data are shown as mean±S.D..
*, $p<0.01$ vs. data of preincubation by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison.

ており，今回の実験で腫瘍が増大した例および LAK 細胞投与の効果が認められなかった例においてはエフェクター細胞の比率が十分でなかったことがその一因として考えられる．

考　　察

Takasugi ら[7]により試験管内における正常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[8]によりナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞と命名された 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，前感作なしに腫瘍細胞に対する傷害能を発揮する[9]．よって，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[10]，乳癌[11]，食道癌[12]，肺癌[13][14]などの症例についての報告があり，いずれも癌の進行とともに NK 活性は低下する傾向にあるとされている．NK 細胞活性を低下させる原因としては，担癌生体におけるサプレッサー細胞の出現[15]，流血中の可溶性免疫複合体[16]やプロスタグランディンの存在[17]，低栄養状態[12]などの報告がある．さらに，試験管内での NK 細胞活性の測定には標的細胞として K562 細胞などの造血系の細胞が用いられることが多く，ヒトの固形腫瘍細胞に対して NK 細胞が抗腫瘍性を発揮するかが問題となる．本研究において，切除材料より組織培養を行った自己腫瘍細胞を標的細胞として NK 細胞の細胞傷害性を検討したが，K562 細胞を標的細胞とした場合と比較し，ほとんど細胞傷害性が認められなかった．すなわち，自己腫瘍細胞に対する NK 細胞活性は10%以下であり，これは NK 細胞抵抗性のヒト肺腺癌由来培養細胞株の PC-3 細胞および同扁平上皮癌由来培養細胞株の PC-10 細胞を標的細胞とした NK 細胞活性とほぼ同様の数値であった．よって，患者の末梢血中に存在する NK 細胞では，宿主内に発育した腫瘍に対する免疫学的抗腫瘍活性を期待することは不可能であると考えられた．

一方，胆癌生体での低下した NK 活性の増強や抗腫瘍活性をもつ細胞の誘導に関して，Grimm ら[18]が興味あ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，自己の固形腫瘍も含めた 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，LAK 細胞と命名された．この細胞の細胞傷害性のスペクトラムは内因性 NK 細胞より明らかに広く，自己腫瘍細胞のみでなく同種腫瘍細胞をも傷害しうる特性をもち，従来の腫瘍免疫反応における

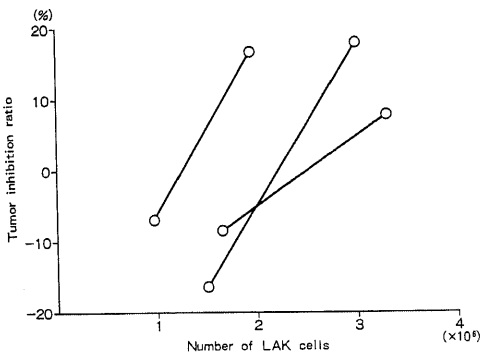

Fig. 5. Positive correlation of the tumor inhibition ratio and the number of LAK cells using chick embryo assay. Three cases of data performed at the same condition as described in Table 1. are shown.

Table 3. Antitumor effect of PBL using Chick Embryo Assay[1)]

Case	Age	Sex	Cell type	Number of PBL injected	Control	No addition group		LAK cell group	
					Tumor weight (mg, mean±S.D.)	Tumor weight (mg, mean±S.D.)	Inhibition ratio (%)	Tumor weight (mg, mean±S.D.)	Inhibition ratio (%)
1	53	M	S	1.05×10^6	22.1±10.5	23.7± 6.3	−7.2	16.1± 7.6	27.1*
2	59	M	A	1.2×10^6	26.7±17.3	27.6± 8.5	−3.5	13.3± 9.3	50.3*
3	70	M	E	1.0×10^6	34.2± 9.0	27.0±14.1	21.0	22.7±10.5	33.6*
4	50	M	L	2.7×10^5	20.5± 3.5	23.1±13.4	−12.7	20.2± 4.0	1.5
5	69	M	A	1.25×10^6	24.1± 7.8	39.5±20.6	−64.0	25.4±12.3	−5.5
6	57	F	A	2.0×10^5	14.1± 3.1	4.5± 2.7	68.1*	4.7± 3.1	66.7*
7	71	M	A	5.0×10^5	33.5±10.6	30.9±10.9	7.9	33.2± 6.7	1.0
8	72	M	E	1.3×10^6	31.1± 9.9	25.7± 4.7	17.4	31.5± 9.0	−1.3
9	78	M	E	2.0×10^6	18.3± 9.3	13.8± 8.0	24.6	27.3± 9.4	−49.5
10	57	M	A	1.5×10^6	51.8±10.7	29.1± 3.1	47.7*	41.0± 5.2	20.9

1) Tumor cells were applied onto the CAM of 10-day-old chick embryos. Lymphocytes were injected to blood vessel on CAM 3 das after tumor transplantation. Four days later, the tumors were excised from the CAM and weighed.
*, $p<0.05$ vs. control by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison.
A, adenocarcinoma ; L, large cell carcinoma ; E, epidermoid carcinoma ; S, small cell carcinoma

特異性をもった細胞傷害性リンパ球とは異なる機能細胞と考えられている[19].

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一つで，Gillisら[20]によって機能性T細胞の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 ($CD4^+$ 細胞[21]) やNK細胞[22]が産生する分子量15000 (ヒト) の糖蛋白である．最近の遺伝子工学の進歩により，大腸菌を利用してrIL-2が容易に得られるようになり，その生物学的活性も証明されている[23]．このIL-2を用い，マイトマイシンC処理またはX線照射した癌細胞でリンパ球を感作し，IL-2存在下で増殖させて特異的抗腫瘍活性をもつリンパ球 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) を誘導しようとする試みがZarlingら[24]によって提唱された．CTLの基礎研究はLAKよりもはるかに古く，rIL-2が作製される以前 (粗製IL-2の時代) から行われており，免疫マウスのリンパ球を腫瘍細胞抗原と混合培養して感作し，次いで粗製IL-2にて増殖させるという方法でCTLを誘導した．

OK-432は，BRMの一種で広く臨床応用されており[4)5)25]，またIL-2誘導作用を有することも知られている．OK-432とともに末梢血リンパ球を2日間以上培養すると，IL-2刺激と同様に，NK細胞抵抗性のRaji細胞やDaudi細胞に傷害活性をもつLAK様細胞 (OK-LAK細胞) が誘導される[26]．

今回，肺癌患者末梢血リンパ球よりLAK細胞，OK-LAK細胞およびCTLを誘導し，これらのエフェクター細胞の表現型と試験管内での細胞傷害活性を検討した．表現型の変化を見ると，LAK細胞，OK-LAK細胞およびCTLのいずれにおいても$CD3^+$，$CD8^+$細胞が有意に増加しており，サプレッサーや細胞傷害性機能をもつT細胞が著しく増加していることは注目に値する．LAK細胞では，$CD4^+$，$CD16^+$細胞が有意に減少したのに対し、OK-LAK細胞とCTLでは，$CD57^+$，$CD16^+$細胞が有意に減少した．LAK活性を示す前駆細胞としては，T細胞由来 (ヒトではCD^{8+}，CD^{8+})[27]とする報告や，NK細胞由来[28]，ヌル細胞 (null cell) 由来[29]する報告もあり，一定の見解が得られていない．したがって，LAK細胞の表現型も様々である．熊谷ら[30]は，前駆細胞が$CD16^+$，$CD3^-$のNK細胞で,LAK細胞も同様であると報告している．本研究では，LAK細胞の表現型では$CD3^+$，$CD8^+$の細胞が著明の増加していることから，その前駆細胞がT細胞由来とする報告に一致している．CTLの表現型に関しては，$CD3^+$，$CD8^+$，$CD57^-$とするIchinoら[31]の報告と同様であった．一方，細胞傷害活性に関しては，NK感受性株のK562細胞に対する細胞傷害活性は，LAK細胞，OK-LAK細胞で著明に増強された．NK細胞抵抗性のヒト肺癌由来培養細胞株や肺癌自己腫瘍細胞に対する細胞傷害活性はLAK細胞，OK-LAK細胞およびCTLのいずれにおいても著明に増強され，自己腫瘍細胞に対してはCTLにおいてとくに高い活性が得られた．Rosenbergら[32]は腫瘍浸潤リンパ球を用いた癌免疫の研究で腫瘍浸潤リンパ球の有効性を指摘し，Shuら[33]は胆癌脾細胞を腫瘍抗原とIL-2を用いて培養したエフェクター細胞がLAK細胞単独よりはるかに有効であると報告している．すなわち，CTLを用いた癌治療が理論的に最も有効と考えられるが，実際に個々の癌症例において特異的な腫瘍抗原でリンパ球を感作し，治療上有効な数のエフェクター細胞を誘導することは困難である．

今回の研究では，CTLの誘導のために自己腫瘍培養細胞を用いたが，手術時の切除材料を用いたので培養時に混合感染を生じることが多かった．最近，より簡単な操作で短期間に均一な癌細胞を継代培養する方法[34]も研究されており，実用化されればCTLを用いた特異的免疫療法が臨床応用される可能性がある．また，CTLの誘導における他の方法として，菅ら[35]の可溶性腫瘍抗原でリンパ球を感作する方法や腫瘍浸潤リンパ球を用いる方法もあるが，その誘導や投与方法などについては問題があり，今後さらに検討されるべきである．

現時点ではIL-2を添加して培養するだけで誘導されるLAK細胞を用いた治療が癌免疫療法の中心となっている．このうち，IL-2を直接生体内に投与し内因性のLAK細胞を誘導する方法は，生体内に投与されたIL-2の血中半減期が約3分と極めて短いこと[36]，IL-2の大量投与については，毛細血管透過性漏出症候群 (Capillary permeability leak syndrome) という極めて重篤な副作用の出現が報告されたこと[32]，などからほとんど注目されず，最近では試験管内でIL-2により誘導されたLAK細胞を投与する養子免疫療法 (adoptive immunotherapy, AIT) が主流となっている．Rosenbergら[37]は，LAK細胞とrIL-2を併用した養子免疫療法の治験を行い，悪性黒色腫の皮膚転移巣の完全消失，結腸癌，胃癌，黒色腫肺転移巣および肺癌原発巣の縮小など，25例中11例に何らかの効果が得られたことを報告した．当教室においても清水[14]が，原発性あるいは転移性肺腫瘍患者に対し，高密度自動細胞培養装置により大量に培養したLAK細胞を気管支動脈より注入して，7例中5例に何らかの抗腫瘍効果が認められたことを報告した．

本研究では，臨床的養子免疫療法の実験モデルとして鶏卵法を応用した．本法は，1912年 Murphy[38]による鶏卵の漿尿膜上にヒト腫瘍が移植可能であるとの報告から開発され，佐々木らにより抗癌剤感受性試験，ヒト腫瘍を用いた抗腫瘍剤のスクリーニング，転移巣の検索などへの応用というように発展してきた[39)40)]．今回は，手術時に切除した腫瘍の組織片を孵化鶏卵の漿尿膜上に移植し，生着した腫瘍の腫瘍血管内にリンパ球を注入して，抗腫瘍効果を検討した．10例中5例において，LAK 細胞注入時の腫瘍阻止率が無添加培養リンパ球注入時のそれを上回っており，LAK 細胞の鶏卵漿尿膜上に移植した腫瘍に対する抗腫瘍性が証明された．しかし，無添加培養リンパ球注入時でも生理的食塩水注入時と比較して腫瘍重量が減少した症例が存在したことは，注入したリンパ球が細い腫瘍血管内で塞栓様効果をもたらした可能性がある．これに関しては，臨床において気管支動脈のような腫瘍の栄養血管内に大量の LAK 細胞を直接注入する養子免疫療法においても同様であり，今後の検討を必要とする．さらに，注入する LAK 細胞数と腫瘍阻止率との関係を注入細胞数を2倍にして検討した結果，3例全例において正の相関が得られ，抗腫瘍性の顕著な増強がみられた．本研究では，プラスチックシャーレを培養容器として用いた静置培養を行っており，LAK 細胞は7日間の培養では1.5倍程度にしか増加せず，10^6〜10^7個の細胞しか回収できなかった．臨床例で養子免疫療法を行う場合には，10^{10}個以上の LAK 細胞を回収する必要があり，高密度自動細胞培養装置等を導入し，高密度で長期間ヒトリンパ球を培養する方法が必要である[14)]．臨床において LAK 細胞を用いた癌免疫療法を行う場合には，その多くが固形癌に対する抗腫瘍性を目的としており，癌細胞だけでなく腫瘍の間質，腫瘍組織内の免疫反応の影響も関与している．鶏卵法は，栄養血管を有する腫瘍組織に対するエフェクター細胞の抗腫瘍効果を検討するもので，腫瘍細胞とエフェクター細胞との接触条件，間質の影響および移植腫瘍組織内の本来の免疫反応などの複雑な要因が関与するという意味において，臨床における養子免疫療法と非常に類似したモデルと考えられる．生体内の抗癌剤感受性試験法として臨床成績と高い相関を示す鶏卵法において LAK 細胞の抗腫瘍活性が証明されたことで，LAK 細胞の養子免疫療法の臨床上の有用性が示唆された．さらに，LAK 細胞より特異的抗腫瘍活性を有する CTL についても基礎的研究を重ね，これらのエフェクター細胞を用いた免疫療法のさらなる展開を期待したい．

結　　論

肺癌患者末梢血リンパ球から誘導される抗腫瘍活性を検討する目的で，各種 BRM 添加培養リンパ球の細胞傷害活性，リンパ球亜群の変化，さらには LAK 細胞の鶏卵法における抗腫瘍活性について検討し，以下の結論を得た．

1．肺癌組織の初代培養を30例に対して施行し，22例 (73.3%) で成功した．

2．末梢血リンパ球の単独培養では，K562 に対する細胞傷害性は認められるものの，同種培養肺癌細胞株や自己腫瘍細胞に対してはほとんど細胞傷害性を認めなかった．

3．末梢血リンパ球に rIL-2 や OK-432 を添加して培養すると，K562 に対する細胞傷害性が増強されるとともに，同種培養肺癌細胞株や自己腫瘍細胞に対しても著明な細胞傷害性が誘導された．また，リンパ球自己腫瘍細胞混合培養でも同様で，特に自己腫瘍細胞に対してきわめて強い細胞傷害性が誘導できた．

4．培養後のリンパ球亜群については，無添加培養リンパ球では培養前とほとんど変化はなかったが，BRM 添加培養リンパ球ではいずれも $CD3^+$，$CD8^+$細胞の増加に対して，$CD4^+$，$CD16^+$細胞の減少が認められた．

5．鶏卵法における抗腫瘍効果は，10例中5例において無添加培養リンパ球より LAK 細胞で高い腫瘍阻止率を認めた．また，注入した LAK 細胞数と腫瘍阻止率は3例全例で正の相関がみられた．

以上より，肺癌患者に対する免疫療法における IL-2 や OK-432 の重要性，すなわち，試験管内でこれらの BRM で誘導されたエフェクター細胞の自己腫瘍に対する有効性が明らかになり，自己腫瘍細胞傷害性リンパ球による養子免疫療法の有用性が示唆された．

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，御鞭撻賜りました第一外科渡辺洋宇助教授に深謝いたします．さらに，本研究の遂行に際し，多大の御教示と御援助を戴いたがん研究所化学療法部佐々木琢磨教授，田中基裕先生をはじめとする化学療法部の諸先生方ならびに第一外科肺グループの諸先生方に厚く御礼申し上げます．

なお，本論文の要旨は，第41回日本胸部外科学会総会 (東京，1988)，第42回日本胸部外科学会総会 (大阪，1989) において発表した．

文　　献

1）橋本邦久，太田伸一郎：高齢者肺癌の外科治療．

Annual Review 呼吸器 (太田保世，諏訪邦夫，堀江孝至，吉村博邦編)，初版，279-283 頁，中外医学社，東京，1988.

2) **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).

3) **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，綱村幸夫，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).

4) **Watanabe, Y. & Iwa, T.**: Clinical value of immunotherapy for lung cancer by the streptococcal preparation OK-432. Cancer, **53**, 248-253 (1984).

5) **渡辺洋宇，清水淳三，吉田政之，橋爪泰夫，山田哲司，岩 喬**：肺癌に対する OK-432 免疫療法－現況と将来－．日外会誌，**90**, 1432-1435 (1989).

6) **日本肺癌学会**：臨床・病理肺癌取扱い規約．改定第3版，15-21 頁，金原出版，東京，1987.

7) **Takasugi, M., Mickey, M. R. & Terasaki, P. I.**: Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. Cancer Res., **33**, 2898-2902 (1973).

8) **Kiessling, R., Klein, 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).

9) **Herberman, R. B. & Holden, H. T.**: Natural cell-mediated immunity. Adv. Cancer Res., **27**, 305-377 (1978).

10) **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).

11) **秋元 実，石井 洋，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).

12) **辻 和男，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).

13) **橋爪泰夫**：肺癌患者末梢血および所属リンパ節リンパ球の抗腫瘍活性の誘導に関する研究．十全医会誌，**95**, 251-267 (1986).

14) **清水淳三**：肺癌の免疫療法に関する研究－特に腫瘍局所における抗腫瘍活性の誘導とその応用に関する研究－．十全医会誌，**98**, 161-174 (1989).

15) **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).

16) **西條長宏**：人末梢リンパ球 Natural killer 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).

17) **湊 長博**：NK 活性発現に影響する諸因子．臨床免疫，**16**, 382-391 (1984).

18) **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).

19) **Minato, N., Reid, L. & Bloom, B. R.**: On the heterogeneity of murine natural killer cells. J. Exp. Med., **154**, 750-762 (1981).

20) **Gillis, S. & Smith, K. A.**: Long term culture of tumor-specific cytotoxic T cells. Nature, **268**, 154-156 (1977).

21) **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).

22) **Kasahara, T., Djeu, J. Y., Dougherty, S. F. & Oppenheim, J. J.**: Capacity of human large granular lymphocytes (LGL) to prodyce multiple lymphokines: Interleukin 2, interferon, and colony stimulating factor. J. Immunol., **131**, 2379-2385 (1983).

23) **Rosenberg, S. A., Grimm, E. A., McGrogen, M., Doyle, M., Kawasaki, E., Koths, K. & Mark, D. F.**: Biological activity of recombinant humam interleukin-2 produced in Escherichia coli. Science, **223**, 1412-1415 (1984).

24) **Zarling, J. M., Raich, P. C., Mckeough, M. & Bach, F. H.**: Generation of cytotoxic lymphocytes in vitro against autologus human leukaemia cells. Nature, **262**, 691-693 (1976).

25) **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 phytomitogen responsiveness in vitro. Cancer, **45,** 476-483 (1980).

26) 石田名香雄，斉藤元男，南条正季：活性化マクロファージの出現から LAK の誘導．Therapeutic Res., **2,** 459-465 (1985).

27) 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).

28) Itoh, K., Tilden, A. B., Kumagai, K. & Balch, C. M.: Leu-11$^+$ 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).

29) 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).

30) 熊谷勝男，藤井昌彦，安保　徹，沢田秀明，暇名宣男：IL-2 誘導自己癌細胞障害性リンパ球 (LAK) の由来とその分化と増殖．日臨免会誌，**11,** 527-531 (1988).

31) Ichino, Y. & Ishikawa, T.: Generation of human cytotoxic T lymphocytes against fresh autologous and allogeneic solid tumors by mixed lymphocyte tumor cell culture with T cell growth factor. Gann, **75,** 436-441 (1984).

32) 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).

33) Shu, S., Chou, T. & Rosenberg, S. A.: Generation from tumor-bearing lymphocytes with in vivo therapeutic efficacy. J. Immunol., **139,** 295-304 (1987).

34) 小林俊介，岡田信一郎，稲葉浩久，佐藤雅美，橋本邦久，仲田　祐：ヒト肺小細胞癌細胞の長期間継代培養と増殖動態に関する研究．抗酸菌病研究雑誌，**38,** 103-111 (1986).

35) 菅　典道，戸部隆吉：癌補助療法としての LAK および CTL 療法．外科治療，**58,** 529-536 (1988).

36) Donohue J. H. & Rosenberg, S. A.: The fate of interleukin-2 after in vivo administration. J. Immunol., **130,** 2203-2208 (1983).

37) Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M.. Leitman, S., Chang, A. E., Ettinghausen, S. E., Matory, Y. L., Skibber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J. T., Seipp, C. A., Simpson, C. & Reichert, C. M.: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. N. Engl. J. Med., **313,** 1485-1492 (1985).

38) Murphy, J. B.: Transplantability of malignant tumors to embryos of a foreign species. J. Am. Med. Assoc., **59,** 874-875 (1912).

39) 佐々木琢磨：鶏卵法による癌悪制度の判定と薬剤感受性試験．ファルマシア，**23,** 58-62 (1987).

40) Uchida, H., Sasaki, T., Tanaka, M., Endo, Y., Nitta, K., Nishikawa, K., Chuman, H. Fukuma, H. & Matsumoto, K.: Response to antitumor agents of murine transplantable tumors implanted onto chorioallantoic membrane of chick embryo. Jpn. J. Cancer Res. (Gann), **78,** 729-736 (1987).

Studies on the Induction of Tumoricidal Activity of Peripheral Blood Lymphocytes in Patients with Lung Cancer ; with Special Reference to Tumoricidal Activity against Autologous Tumor Cells

Masayuki Yoshida, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 99, 815—826 (1990)

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

Abstract

The tumoricidal activity of peripheral blood lymphocytes (PBL) against autologous tumor cells in lung cancer patients was studied using various assay methods. Natural killer (NK) cell activity, induction of cytotoxic activity by recombinant interleukin 2 (rIL-2), OK-432 or autologous mixed lymphocytes tumor cell culture (MLTC) and identification of lymphocyte subsets analysis using monoclonal antibodies were assayed. As an experimental model of adoptive immunotherapy (AIT), the tumoricidal activity of lymphokine activated killer (LAK) cells, induced from autologous PBL against autologous tumor tissue, was studied using the chick embryo embryo assay. When the PBL were cultured without an inducing substance, cytotoxic activity was not observed against NK-resistant human lung tumor cell lines or autologous tumor cells. Therefore, spontaneous tumoricidal activity of PBL was not expected. When a 7-day culture of PBL stimulated with rIL-2 or OK-432 was used, their cytotoxic activity was greatly enhanced against NK-resistant human lung tumor cell lines and autologous tumor cells, as well as K562. When the 7-day culture of PBL with rIL-2 and autologous tumor cells treated with mitomycin C (MMC) was used, the cytotoxic effector cells with the strongest tumoricidal activity against autologous tumor cell were induced. Analysis of lymphocyte subsets of the effector cells cytotoxic against autologous tumor cells showed that the $CD3^+$ and $CD8^+$ cells increased and $CD4^+$ and $CD16^+$ cells decreased after incubation with rIL-2 and other stimulants. The antitumor activity of the effector cells, induced from autologous PBL, was studied against the autologous tumor tissues implanted onto the chorioallantoic membrane of chick embryo. In 5 out of 10 cases, the tumor inhibition ratio was higher with the injection of LAK cells than with the injection of lymphocytes cultured with no addition. The tumor inhibition ratio correlated with the number of injected LAK cells. From these findings, the effector cells induced in vitro using various biological response modifiers (BRM) may be useful for immunotherapy in lung cancer patients.