

肺癌・乳癌患者における末梢血，所属リンパ節および
腫瘍内浸潤リンパ球の細胞障害活性の比較：
養子免疫療法への応用を目的とした長期培養

鳥取大学医学部外科学第二教室（主任 森 透教授）

石 黒 清 介

Cytotoxic activity of peripheral blood-, regional lymph node-, and tumor infiltrating lymphocytes in lung and breast cancer: Long-term culture of lymphocytes for the practical use to adoptive immunotherapy

Kiyosuke ISHIGURO

*Department of Surgery, Faculty of Medicine,
Tottori University, Yonago 683, Japan*

ABSTRACT

For the practical use to adoptive immunotherapy of cancer, peripheral blood lymphocytes (PBL), regional lymph node lymphocytes (RLNL) and tumor infiltrating lymphocytes (TIL) from 12 lung and 13 breast cancer patients were cultured with interleukin-2(IL-2) for 20 days. Cell numbers decreased on day5, and gradually increased up to 5 times as much as set up on day20. In PBL culture macrophages proliferated and number of lymphocytes were diminished in some cases. Cytotoxic activity was measured in a 4 hours ⁵¹chromium release assay on day5, day10 and day20. Lymphokine-activated killer (LAK) activity against target Daudi cell was attained on day5, but diminished on day10, then attained again on day20. PBL had the highest LAK activity through the culture. Cytotoxicity against autologous cancer cells was attained in RLNL and TIL on day20. Long-term cultured lymphocytes were tested for their surface marker. RLNL and TIL were comprised largely of CD3+ cells. Especially RLNL had a large number of CD4+ cells. There was no correlation between the cytotoxicity and the percentage of phenotype which had a surface marker tested.

These results show that long-term culture is useful to generate large scale number of LAK cells, and RLNL and TIL are more effective than PBL for the effector of adoptive immunotherapy of cancer.

(Accepted on November 5, 1990)

T細胞増殖因子（TCGF）として発見された interleukin-2（以下 IL-2）が，末梢血リンパ球に，自己の癌細胞のみならず，多くの癌細胞に対する抗腫瘍活性を誘導することが明らかにされて

きた²⁾³⁾⁴⁾。このIL-2で活性化されたリンパ球は lymphokine-activated killer cell (LAK細胞) と呼ばれている。その後IL-2の大量生産が可能となり，動物実験をもとにLAK細胞を大量培養し

て担癌生体に移入するいわゆる LAK 療法が Rosenberg ら¹⁶⁾¹⁷⁾によって行われて、従来の治療に無効であった進行癌に対しても高い有効性を示すことが明らかになった。しかしその後多くの施設で本療法が追試された結果、腎癌、悪性黒色腫などの一部の癌に対して有効性は認められたが、当初期待されたほどの効果は得られなかった。

一方、IL-2によって腫瘍内浸潤リンパ球を増殖させることが可能となり、Rosenberg らはマウスの実験によって、LAK 細胞の50~100分の1の細胞数の移入で同様の効果を認めたと報告した¹⁸⁾。

われわれは肺癌患者の末梢血リンパ球、所属リンパ節リンパ球、腫瘍内浸潤リンパ球の3者についてそれぞれの抗腫瘍活性を中心に比較検討を行ってきたが¹²⁾、今回これらの effector としての養子免疫療法への応用を目的として、長期間培養による細胞障害活性の経時的変化と細胞数増加度、および増殖するリンパ球の subpopulation の検討を行った。

対 象

1987年6月から1988年3月までに鳥取大学医学部付属病院第2外科並びにその関連病院で外科手術を施行した原発性肺癌12例、乳癌13例を対象とした。

患者の年齢は肺癌49-75歳、平均64.5歳で男性9例、女性3例、乳癌40-67歳、平均56.1歳で13例全例女性であった。

方 法

1. リンパ球および腫瘍細胞の分離

リンパ球の分離は Nakamura¹²⁾の方法に準じて行った。末梢血リンパ球(peripheral blood lymphocytes, 以下 PBL)を分離するにあたっては、手術直前に患者より約20cc採血し(ヘパリン加)、Ficoll-Paque 比重遠心法(700×g, 20min, 室温)によりまず単核球(mononuclear cell, 以下 MNC)を分離した。そして MNC を一晩プラスチックシャーレで培養して可及的に付着性細胞を除去したものを PBL として使用した。リンパ節と腫瘍塊は Hanks 平衡塩類溶液(以下 Hanks 溶液)中で細切し、酵素処理を行わずにスライドグラスで圧挫した後、ステンレスメッシュを通して細胞浮遊液とした。そして末梢血と同様に MNC を分離した。この分離した MNC 中には腫瘍細胞も

含まれるため、さらに不連続密度勾配法(100%, 75% Ficoll-Paque, 500×g, 30min, 室温)によって腫瘍細胞と MNC を分離した。腫瘍細胞は分離洗浄後直ちにフリーザー(-80℃)で凍結保存し(RPMI1640培地+10% FCS+10% DMSO 約1mlに入れ)細胞障害活性測定時の target とした。末梢血と同様に MNC より付着性細胞を可及的に除去したものをそれぞれ所属リンパ節リンパ球(regional lymph node lymphocytes, 以下 RLNL)、腫瘍内浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocytes, 以下 TIL)として以下の実験に供した。

2. リンパ球の培養

リンパ球の培養は RPMI1640培地に10%非働化ヒト AB 型血清, 2mM L-glutamine, 2×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 200unit/ml penicillinG, 200μg/ml streptomycin を含んだ培養液(以下 complete medium)を用いて行った。

recombinant interleukin-2(以下 rIL-2, 武田薬品工業供与)は1unit/mlの濃度で、リンパ球は 1×10^6 個/mlに調整して24ウェルのマイクロプレート(Nunk, Denmark)に1mlずつ分注し培養を開始した。rIL-2は5日毎に追加し、培養液は5日目に1ml, 10日目には2ml追加して expansion した。

3. 細胞障害活性の測定

細胞障害活性は4時間の⁵¹Cr release 法¹²⁾で測定した。LAK 活性は target として Daudi 細胞⁷⁾を用いた。Daudi 細胞は complete medium(ただし血清は FCS)で継代培養中の細胞のうち viability の良好な細胞を選択した。Daudi 細胞 $1 \sim 5 \times 10^6$ 個に対して $100 \mu\text{Ci}$ の⁵¹Cr と約1mlの complete medium を加え、90分間 incubator (37℃, 5% CO₂)の中で、15分毎に攪拌しながら培養した後、Hanks 溶液で5回洗浄したものを target とした。自家腫瘍は解凍後直ちに complete medium で2回洗浄し生細胞を計測して、Daudi 細胞と同様にラベリングを行った。ただし自家腫瘍は Daudi 細胞に比べ viability が劣る場合が多いため、⁵¹Cr の取り込みをよくするために3回と4回目の洗浄の間に complete medium に入れ、30分間 incubator で培養するという操作を追加した。

effector と target の比率(ET 比)はすべて10:1に設定した。まず丸底96ウェルのマイクロプレ

ートに target を 1×10^4 個/ウェル入れ, その上に effector を 1×10^5 個ずつ加えた後, 全量で $200 \mu\text{l}$ となるように complete medium を加えて, incubator で 4 時間培養した. 培養終了後プレートを $500 \times g$, 5 分, 遠心してその上清を $100 \mu\text{l}$ 取り, その放射活性を gamma counter (Aroka, ARC-221 Autowell gamma system) で測定した. 測定は全て triplicate で行い, % cytotoxicity は以下の計算式で求めた.

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximum release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

maximum release は target を complete medium の代わりに HCl (2 N) を $190 \mu\text{l}$ 加えて破壊した上清 $100 \mu\text{l}$ の放射活性とし, spontaneous release は effector を加えず target のみを培養した complete medium 上清 $100 \mu\text{l}$ の放射活性とした.

4. リンパ球の subpopulation の検討

培養20日目のリンパ球の subpopulation を検討するため, リンパ球膜抗原に対するモノクローナル抗体で染色し, 蛍光顕微鏡下で陽性細胞率を算出した.

使用した一次抗体は NU-T3 (CD 3), NU-TH/I (CD 4), NU-TS/C (CD 8), NU-Ia (HLA-DR) (ニチレイ) で, 二次抗体は fluorescein-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin (Becton Dickinson, USA) を用いた.

染色方法はまず 1×10^6 個のリンパ球に対して $10 \mu\text{l}$ の一次抗体を加え, 4°C , 20分 incubation して, staining buffer (phosphate buffer saline, pH7.4+2%非働化 fetal bovine serum+0.05% NaN_3) で3回洗浄後, 20倍に希釈した二次抗体を $20 \mu\text{l}$ 加えて同様に incubation し, 洗浄を行った.

5. 統計解析

データは平均値±標準誤差 (mean±S.E.) で示した. 2郡間の平均値の有意差の検定は T 検定を用いた. ただし, 分散が異なる場合は Cochran-Cox 法で検定を行った. 有意水準 (P) を 0.05 とした.

結 果

1. 細胞数

PBL および RLNL は全例 1×10^6 個で培養が

開始可能であったが, TIL は症例によっては採取可能な腫瘍塊が小さく, リンパ球浸潤が少ないため, 1×10^6 個で開始できないことがあった. それぞれの平均値を図1に示す. 5日目では3者とも増加を示さず, むしろ減少したが, 5日以降に徐々に増加し始め, 10日目で約2倍, 20日目で約5倍に増加した. 個々の症例でみると RLNL は全例増加を示したが, PBL と TIL に全く増加しない例があった. PBL に関しては一晩培養して付着細胞 (macrophage (以下 $M \phi$), dendritic cell 等) は可及的に除去操作を行っていたが, 培養を継続するにつれて $M \phi$ が出現してくることがあった. この場合リンパ球の増加がみられないことがあった. TIL も症例によって増加度の差が大きく, 培養開始から20日までに少ないもので3倍, 最大に増加したもので60倍を示した. TIL と転移陽性の RLNL は10日には腫瘍細胞がほぼ死滅し, 20日目には腫瘍は消失していた.

2. 細胞障害活性

PBL, RLNL および TIL の細胞障害活性の経時的变化を図2, 3, 4に示す. 無刺激群は培養開始後5日目に活性を測定したものである. PBL の Daudi 細胞に対する細胞障害活性 (以下 LAK 活性) の平均値は無刺激群で $12.2 \pm 4.5\%$, 5日目で $68.3 \pm 7.2\%$, 10日目で $55.5 \pm 7.5\%$, 20日目で $70.0 \pm 7.0\%$ を示した. 自家腫瘍に対する細胞障害活性はそれぞれ $2.7 \pm 3.8\%$, $18.3 \pm 6.7\%$, $11.3 \pm 6.0\%$, $14.5\% \pm 5.3\%$ を示した. LAK 活性は無刺激群に対し5日目, 10日目, 20日目の何れも有意に ($P < 0.01$) 高値を示したが, 自家腫瘍に対しては何れも有意差を認めなかった ($P > 0.05$). また10日目の LAK 活性は5日目および20日目の値に対して有意差は示さなかった ($P > 0.05$).

RLNL の LAK 活性は無刺激群で $1.7 \pm 0.7\%$, 5日目で $46.3 \pm 7.6\%$, 10日目で $36.8 \pm 6.3\%$, 20日目で $65.2 \pm 5.0\%$ を示した. 自家腫瘍に対する細胞障害活性はそれぞれ $1.7 \pm 2.1\%$, $9.0 \pm 4.9\%$, $10.9 \pm 4.2\%$, $35.7 \pm 6.9\%$ を示した. LAK 活性は5日目と20日目において無刺激群に比較して有意な ($P < 0.01$) 高値を示し, 10日目から20日にかけて有意な ($P < 0.01$) 上昇を認めた. 自家腫瘍に対する細胞障害活性には20日目において無刺激群に対して有意に ($P < 0.01$) 高値を示した. また自家腫瘍に対する細胞障害活性が LAK 活性より高値を示す症例も存在した.

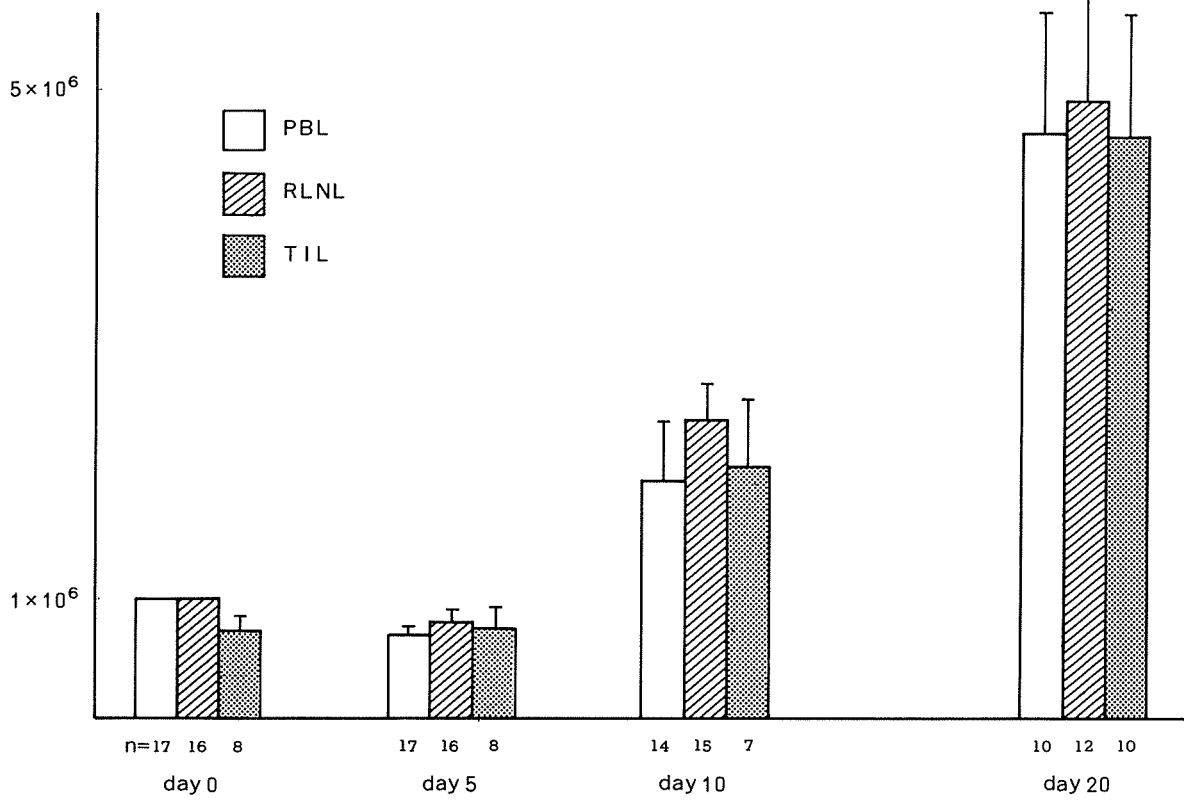


図1. 細胞数の経日変化
mean ± S.E.

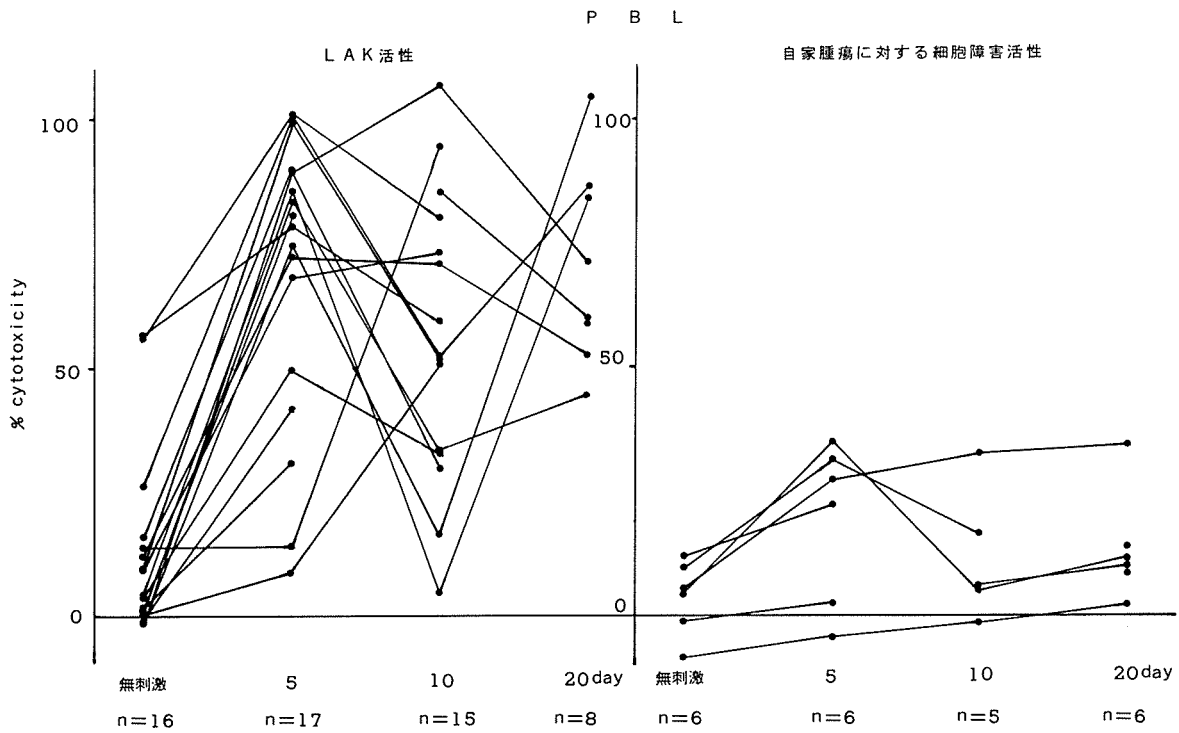


図2. 末梢血リンパ球の細胞障害活性

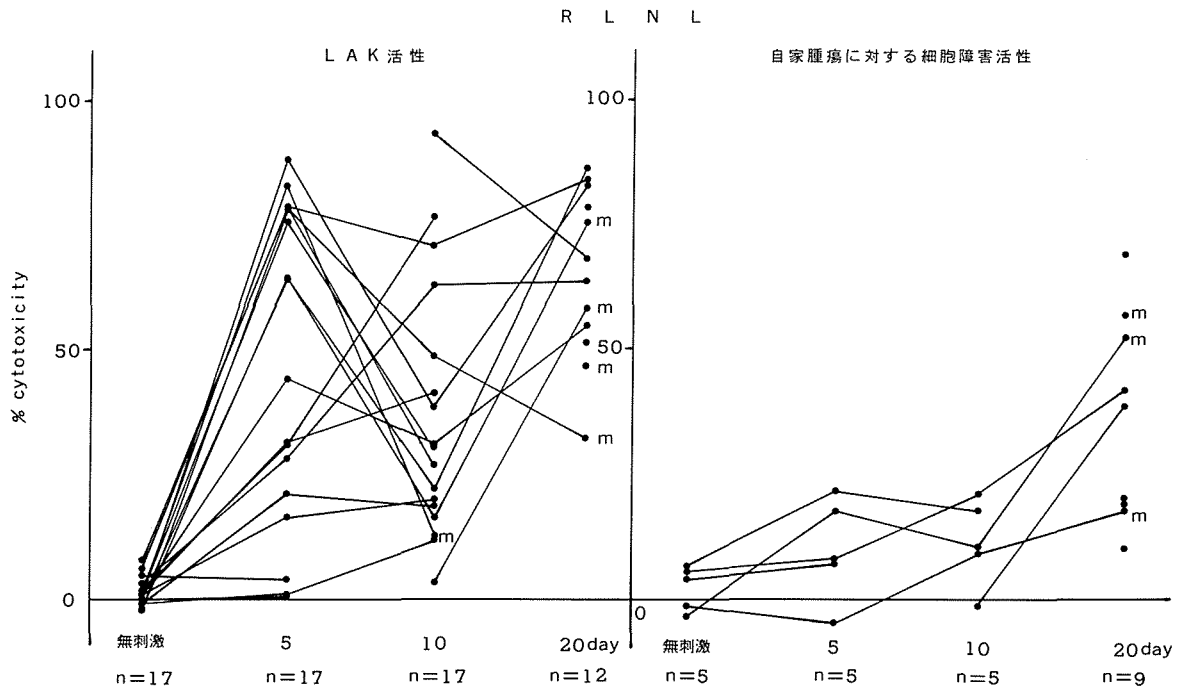


図 3. 所属リンパ節リンパ球の細胞障害活性
m: 転移陽性のリンパ節

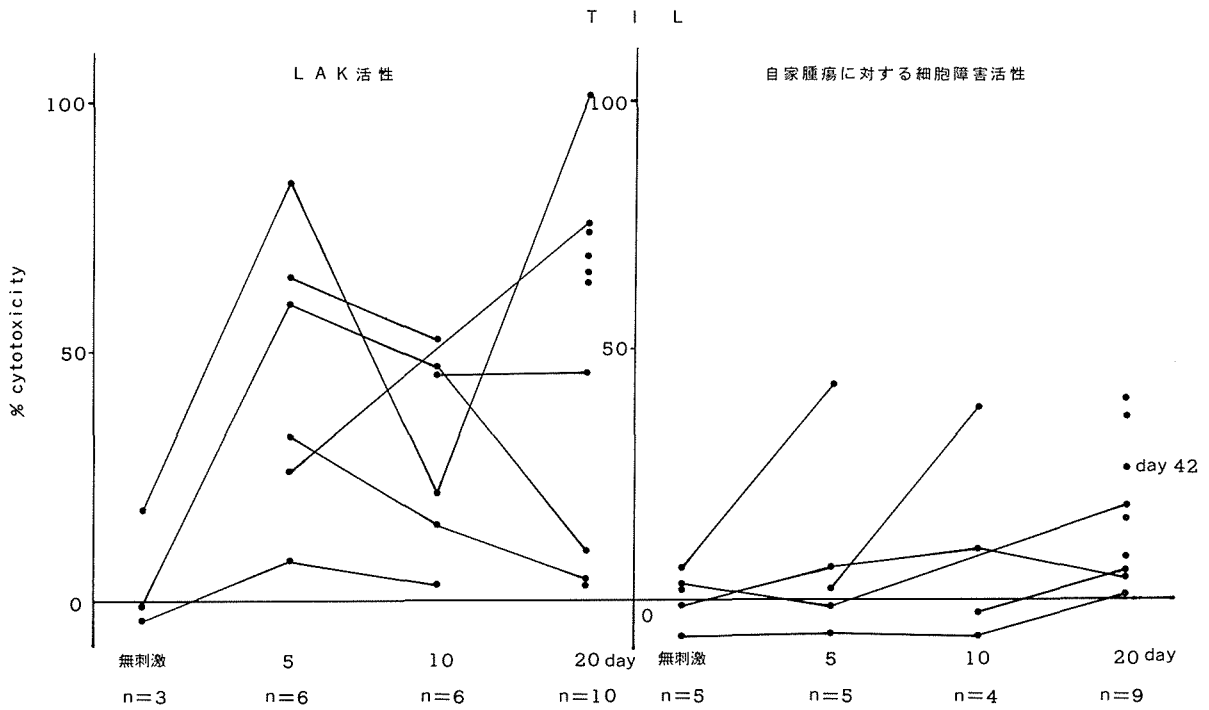


図 4. 腫瘍内浸潤リンパ球の細胞障害活性

TIL の LAK 活性は無刺激群で $4.0 \pm 6.9\%$ 、5日目で $45.8 \pm 11.5\%$ 、10日目で $30.7 \pm 8.3\%$ 、20日目で $52.8 \pm 11.1\%$ を示し、無刺激群に比較し全て有意に ($P < 0.01$) 高値を示した。自家腫瘍に対する細胞障害活性は、それぞれ $0.6 \pm 2.3\%$ 、 $8.8 \pm 9.0\%$ 、 $9.7 \pm 10.6\%$ 、 $18.8 \pm 5.3\%$ であったが、無刺激群に比較し有意に ($P < 0.05$) 高値を示したのは RLNL と同様20日目のみであった。

以上を総括すると、LAK 活性に関しては PBL, RLNL, TIL とともに5日目で上昇した活性が10日目で低下する傾向を示し20日目で再び上昇する傾向を示した。また5日目、10日目、20日目ともに PBL の活性が最も高値を示し、次いで RLNL, TIL の順であった。注目すべきことは、20日目の活性が PBL, RLNL では最低でも30%を越えたのに対し、TIL ではリンパ球が明らかな増加を示したにもかかわらずほとんど障害性を示さない症例が認められたことである。

自家腫瘍に対する細胞障害活性はその測定手技が困難であるため、症例が少数であったが、20日

目の RLNL と TIL で高い障害性が示された。また自家腫瘍に対し障害性を有する場合、LAK 活性も高く、特異的に自家腫瘍だけを障害するリンパ球は誘導されなかった。

3. 培養20日目のリンパ球の subpopulation

培養20日目のリンパ球の subpopulation の分析結果を図5に示す。pan T細胞のマーカーである CD 3 陽性細胞の割合は PBL において $41.7 \pm 9.0\%$ であるのに対し、RLNL は $67.2 \pm 7.2\%$ 、TIL は $73.5 \pm 6.8\%$ と有意に ($P < 0.01$) 高値を示した。helper/inducer T細胞のマーカーである CD 4 陽性細胞の割合は RLNL において $45.5 \pm 6.8\%$ と PBL の $16.4 \pm 3.8\%$ に比較し有意に ($P < 0.01$) 高値を示し、suppressor/cytotoxic T細胞のマーカーである CD 8 陽性細胞の割合は PBL においては $37.9 \pm 6.7\%$ 、RLNL では $23.5 \pm 2.9\%$ と逆転を示した。TIL は CD 4 / CD 8 が $0.3 \sim 33.5$ とばらつきが大きく、また大多数の細胞が CD 3 陽性かつ CD 4 陽性の T細胞である症例も存在した。活性化 T細胞としての指標である HLA-DR の発

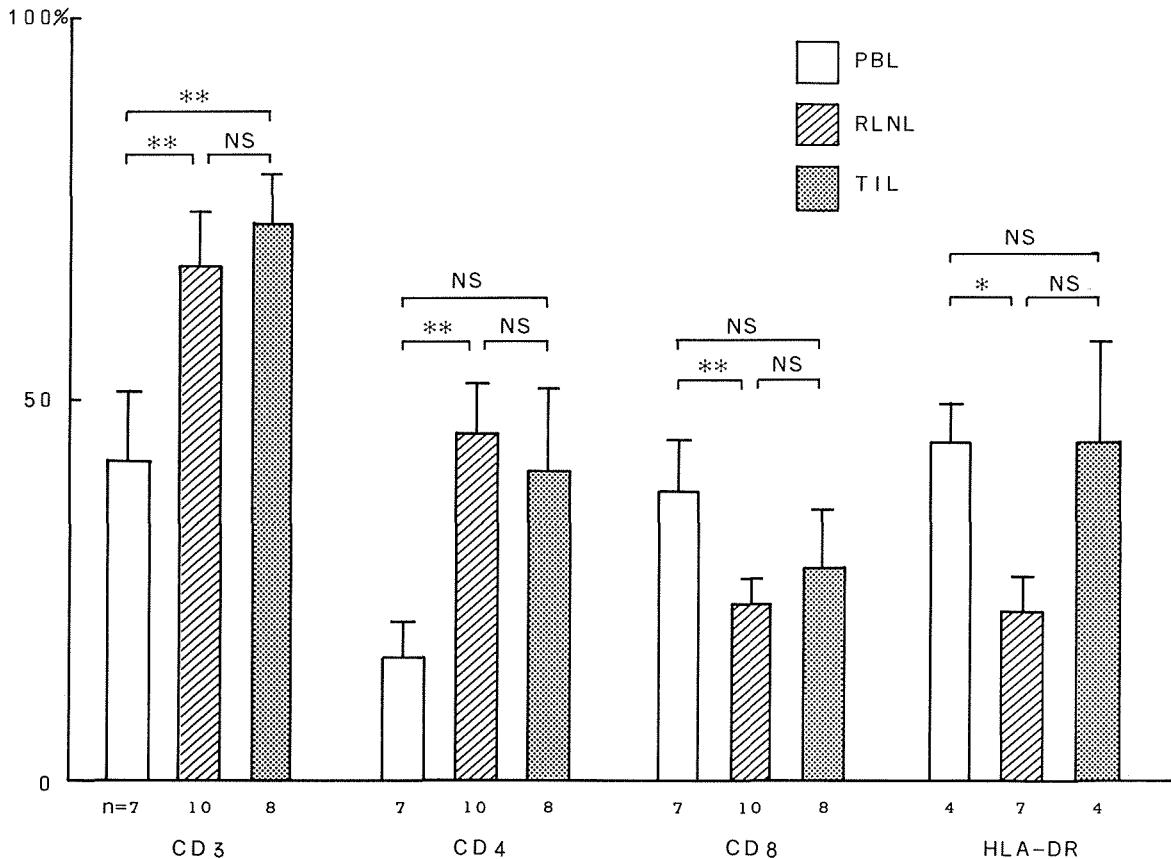


図5. 培養20日目におけるリンパ球の subpopulation の比較

** : $P < 0.01$ * : $P < 0.05$ NS : $P > 0.05$ mean \pm S.E.

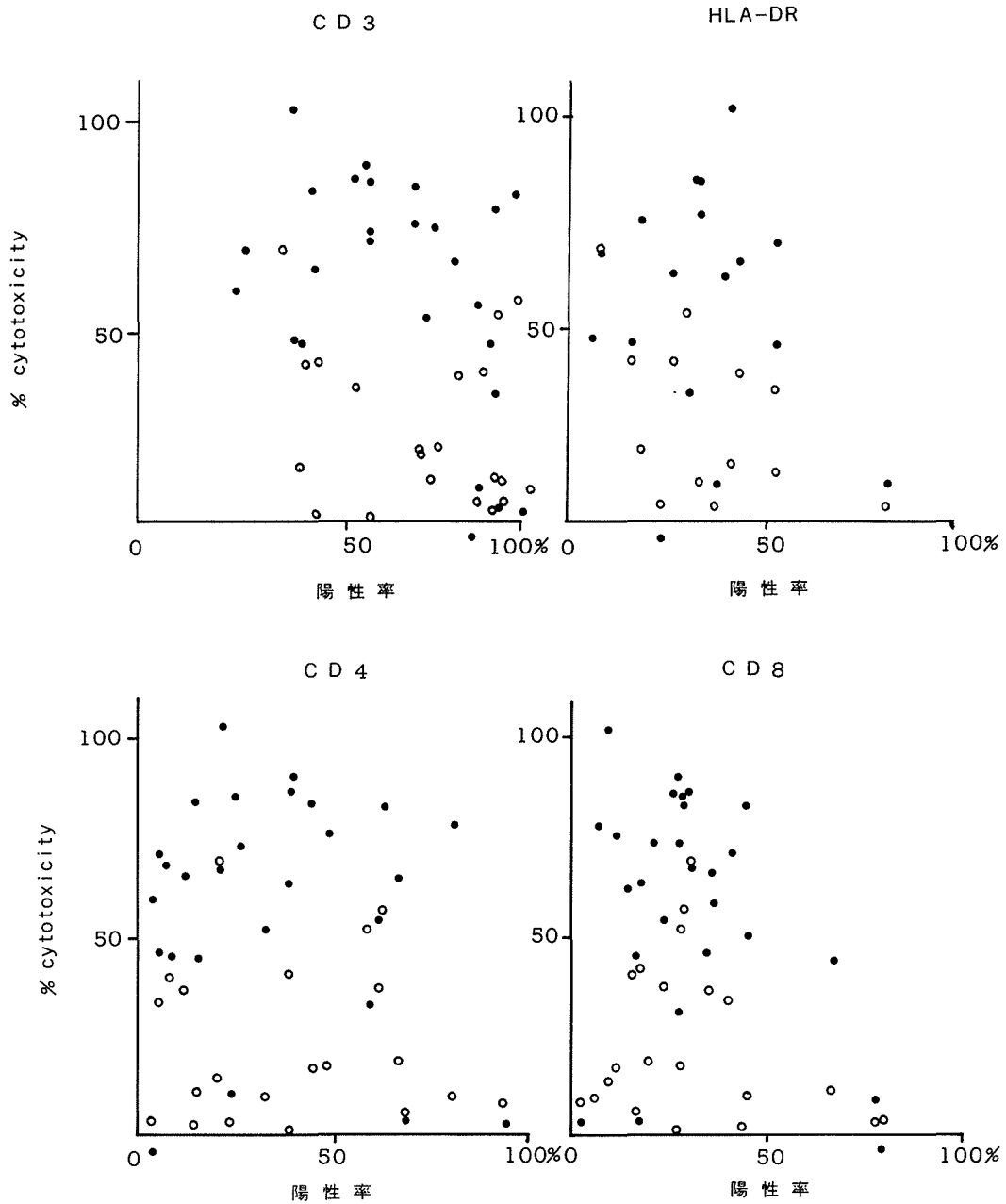


図6. リンパ球の subpopulation と細胞障害活性の相関
target : ● Daudi 細胞, ○ 自家腫瘍細胞

現率は RLNL が最も低値を示した。

つぎに細胞障害活性とリンパ球の subpopulation の間に有意の相関関係が存在するか否かを検討した(図6)。その結果、本実験で検討した表面マーカーに関しては細胞障害活性との間に相関関係は認めなかった。

考 察

Muul ら¹¹⁾によれば PBL を *in vitro* で rIL-2 とともに培養すると 2~3 日で細胞障害活性が出現し、5 日目頃に活性値は最高となり、以後漸減する。Nakamura ら¹²⁾の実験でも同様の結果が得られた。したがって活性の最も高い培養 5 日目のリンパ球を移入すれば最も効果的であろうとの判断

で、LAK療法は行われてきた。しかし5日間の培養では細胞数の増加はみられず、むしろ減少するため、大量のリンパ球を得るには頻回の成分採血と大規模な培養設備、人手を必要とした。したがって臨床的に治療として成立するためにはさらに効果的である必要があった。今回の実験はLAK細胞をPBLの長期培養によってどの程度増殖させることが可能であるのか、また自己の癌細胞に対する細胞障害活性も含めて細胞障害活性がどのように変化していくかをRLNL、TILと比較し、どのeffectorが効果的であるかを(ただしin vitroにおける4時間の ^{51}Cr release法で検出される細胞障害活性が高値を示すのが効果的と仮定した場合)検討した。

細胞の増加度に関しては5日目は減少したが、これは他の報告¹¹⁾でも同様であった。減少する原因について言及している論文はほとんどみあたらないが、活性化されたMNCがプラスチックシャーレに付着するため、ピペッティングでは簡単に遊離しないと操作上の問題もあると思われる。PBLではリンパ球が増加を示さずM ϕ が著明に増加する現象がみられた。本実験ではプラスチックシャーレでMNCを一晩培養して可及的にM ϕ の除去は行ったが、除去が不十分であったか、あるいは除去後の浮遊細胞中にM ϕ のprecursorが存在し、何らかの刺激を受けてM ϕ へ分化した可能性も考えられる。いずれにしてもこのM ϕ が出現した場合はリンパ球の増加は抑制された。Soneら²¹⁾¹³⁾はM ϕ によりLAK細胞の誘導が抑制されることを報告しているが、逆にリンパ球にM ϕ を加えるとT細胞由来のLAK活性が誘導されるとの報告もあり¹⁹⁾²⁰⁾、これらは培養条件の差異あるいは培養期間によっても異なってくると考えられる。われわれが行った実験でも乳癌患者のPBLを無血清培地(ASF104, 味の素)に1%ヒトアルブミンを加えて培養したところ、付着性細胞の除去操作をしなくてもリンパ球は著明に増加した。それに対し本実験で使用した培地(RPMI1640培地+10%ヒトAB型血清)では、付着性細胞の除去操作を行わないとやはりM ϕ が著明に増加しリンパ球は増加を示さなかった。PBLに対しRLNLとTILではM ϕ が増加することはなくリンパ球は増加したが、TILでは全く増加しない症例も存在した。TILが増加を示さなかった理由は不明であるが、切除した腫瘍塊が小

さい場合、特に乳癌の組織型が硬癌の場合、分離可能なTILの絶対数が少数で、75%と100%の不連続密度勾配で腫瘍細胞とMNCを十分に分離できない状態で培養を開始しなければならないことがあり、この場合リンパ球の増加がみられないことがあった。平均すると3者とも20日間で約5倍まで増加した。鷹尾ら²¹⁾は14日間まで培養し健康人PBLが約5倍に増加したと報告しているが、本実験では培養液の交換を行わないで培養液を追加していったことなどの培養条件の差異が増殖度の低い原因と思われる。したがって大量のeffectorを獲得するためには頻回の培養液交換と一定の細胞密度以上のリンパ球で培養しないこと(2.0×10^6 個/ml以下)が必要と考えられる。

つぎに細胞障害活性に関して、Daudi細胞をtargetとしたLAK活性は10日目に低下する傾向があるが、培養を継続していくと再び上昇を示すことが確認された。本実験では培養20日目のリンパ球のsubpopulationしか検討していないので、その変動は不明であるが、培養日数によりeffectorのsubpopulationに差異が生じたとも考えられる。Itohら⁵⁾⁶⁾はLAK活性を示すMNCはNK細胞が大部分を占めると考え、Sawadaら¹⁸⁾もCD16陽性のNK細胞で最も高いLAK活性を認めている。また1~2日の短期培養ではNK細胞由来のLAK活性が誘導され、3~4日以降はT細胞由来のLAK活性が誘導されてくるという報告もある⁹⁾¹⁴⁾。したがって本実験において5日目のLAK活性はNK細胞によるものが主で、20日目はT細胞由来のLAK活性が主と考えられる。一方10日目にはNK細胞が減少したために、あるいは活性を消失したためにLAK活性が低下したと推定される。しかし本来NK細胞の絶対数の少ないTILやRLNでもPBLと同様の反応を示すことから、むしろ5日目以降に何らかの抑制系が作動したと考えればこれらの現象をうまく説明できる。Mukherjiら¹⁰⁾はRLNLのクローニングによりIL-2でsuppressor T cellを誘導し、その機能解析を行っているが、suppressor T cellをPBLに加えることによって、自家腫瘍に対する障害活性が低下したと述べている。われわれが養子免疫療法を実施するうえで、heterogeneousな細胞を培養しているかぎり、IL-2によりsuppressor系の細胞も誘導する可能性もあることは考慮しなければならないことである。

自家腫瘍に対する細胞障害活性は平均すれば20日目におけるRLNLとTILで無刺激群に対し有意に高値を示したが、個々の症例ではPBLにも40%以上の細胞障害活性を認めた症例も存在した。Rabinowichら¹⁵⁾もTILとPBLを比較し、3～5週間の培養で、TILに高い細胞障害活性を認めている。彼らの実験においてはET比を50:1に設定しているのに対し、本実験においてET比を10:1とした理由は、この比率においても細胞障害活性を十分に認める症例が存在したからであった。またET比を上昇させることによって、非特異的細胞障害活性(つまりLAK活性)の影響が大きくなり、自家腫瘍を特異的に障害するcytotoxic T cell (CTL)が誘導されて自家腫瘍を障害したかどうかは隠蔽されてしまう可能性もあると考えたためである。実際、自家腫瘍に対する細胞障害活性が高値を示した症例はすべてLAK活性も高値を示した。したがって非特異的細胞障害活性が自家腫瘍を障害した部分もかなりあると考えられる。特異性を調べるためにはcold target inhibition testなどの方法があるが、自家腫瘍を多く必要とするため、本実験では行えなかった。ただし、LAK活性を上回る自家腫瘍障害活性が誘導されたリンパ節が1例存在した。おそらくCTLが誘導されたものと思われる。

以上、細胞障害活性の点からみると、20日間という長期培養を行ってもLAK活性はPBL、RLNL、TILともに十分保たれるが、自家腫瘍に対する障害活性はPBLには誘導されず、RLNLとTILにおいては長期培養ではじめて誘導されてきた。量的な差が存在する可能性はあるが、RLNLとTILには潜在的に自家腫瘍に対して特異的な障害性を有する細胞が存在するものと考えられる。ET比を変化させることによって、異なった結果、つまりPBLにも自家腫瘍障害性がみられたかもしれない。しかしこのことは逆に、非特異的細胞障害性だけでは十分な効果が得られないのではないかと、また効果を得るためには大量のeffectorを必要とするのではないかと推察される。

つぎにリンパ球のsubpopulationに関して検討を加えると、本実験では培養20日目のリンパ球についてのみ解析しているため、変動については論評しかねるが、RLNLとTILでT細胞の割合が多く、特にRLNLではCD4陽性細胞の割合が多かったということは、培養前に解析したNa-

kamuraら¹²⁾の結果と差異はなかった。しかし一部でCD4あるいはCD8陽性細胞がほとんどを占めるようなRLNL、TILが存在した。これらはなんらかのregulationが培養中に働いたと考えられる。このように長期培養においてある特定のクローンだけが誘導されてくるという現象がなぜ起こるかということは難しい問題であるが、培養条件だけでなく、宿主のimmunityが関わってくるのかもしれない。

effectorのsubpopulationと細胞障害活性との間には、本実験で調べた表面マーカーでは相関関係は認めなかった。LAK活性についてはPBLで最も高値を示したので、他家の報告のようにCD16陽性のNK細胞が強く関与していると思われる。本実験ではNK細胞のマーカーを検討していないため断言はできないが、T細胞のマーカーであるCD3陽性細胞が50%以下の低値を示した症例に高いLAK活性を認めているところからもNK細胞の関与が推定される。自家腫瘍に対する細胞障害活性はCD8あるいは活性化T細胞のマーカーであるHLA-DR陽性細胞の比率が高ければ、高値を示すであろうと予想していたが、陽性率の高い症例ではむしろ細胞障害活性は低値を示した。CD8陽性細胞はsuppressor T細胞の可能性もあると思われる。

養子免疫療法を行う際、いかなる種類の細胞を移入することが最も効果的であるかということは常に問題になることである。今までは細胞障害活性の高いeffectorをいかに大量に培養するかが一つの課題であった。多くの研究により、どの表面マーカーを有するeffectorが、高いLAK活性を示すかということはほぼ解明されてきた。そしてこれらの細胞障害活性の高いeffectorだけを大量に培養して養子免疫療法に応用しようとする試みもある⁸⁾。Vankyら²³⁾²⁴⁾は手術時の末梢血リンパ球が自家腫瘍を障害した癌患者の術後生存率が、細胞障害性を示さなかった患者に比べ有意に高いことを報告している。したがって養子免疫療法に用いるeffectorとして、自家腫瘍を特異的に障害するeffectorを移入することが理想的であろうとは予想されることである。しかしBoldtら¹⁾が行った最近の報告では、LAK療法での治療効果と移入したリンパ球の細胞障害活性(自家腫瘍に対する細胞障害活性も含めて)との間には全く相関関係が存在しなかったという。

また Yamaki ら²⁵⁾はラットの腫瘍内に LAK 細胞を注入することで CTL が局所に誘導され、腫瘍が退縮したと報告した。これは移入したリンパ球が直接腫瘍細胞を障害せず宿主の immunity を誘導したためと考えられる。このように in vivo において移入された effector がいかなる働きをするかということはいまだ不明な点が多く、今後の研究の課題である。

結 語

肺癌、乳癌患者の末梢血、所属リンパ節、および腫瘍内浸潤リンパ球の IL-2 刺激による長期培養における、細胞障害活性の経時的変化と、誘導されるリンパ球の subpopulation の検討を行い以下の結論を得た。

1. 細胞数は 3 者共に培養 5 日目に減少するが、以後漸増し 20 日目には約 5 倍まで増加した。
2. LAK 活性は 3 者共に培養 5 日目には高値を示し、10 日目には低下傾向を示すが、20 日目には再び上昇した。末梢血リンパ球が最も高値の LAK 活性を示した。
3. 自家腫瘍に対する細胞障害活性は、所属リンパ節と腫瘍内浸潤リンパ球の長期培養により誘導された。
4. 長期培養により増加してくるリンパ球の subpopulation の比率は培養前とほぼ同じと思われたが、一部の所属リンパ節リンパ球と腫瘍内浸潤リンパ球で、CD 4 あるいは CD 8 陽性細胞のクローンのみが増加することが認められた。
5. 細胞障害活性とリンパ球の表面抗原陽性率との間には (CD 3, CD 4, CD 8, HLA-DR に関しては) 相関関係は認められなかった。

以上、本研究において著者は、末梢血リンパ球の長期培養による LAK 細胞誘導の可能性と、effector として所属リンパ節リンパ球および腫瘍内浸潤リンパ球の細胞障害活性という点からみた養子免疫療法への有用性を明らかにした。

稿を終えるにあたり、終始懇切な御指導御校閲を賜った、森 透教授に心から謝意を表します。また、研究材料を御提供いただきました国立米子病院外科、池田 貢先生、福井 甫先生、博愛病院外科、衣笠陽一先生および本研究を実施するにあたって御協力いただきました鳥取大学医学部外科学第二教室の教職員各位に謝意を表します。

本研究の一部は、第47回日本癌学会総会(東京)、第28回日本胸部外科学会総会(東京)において発表した。

文 献

- 1) Boldt, D.H., Mills, B.J., Gemlo, B.T., Holden, H., Mier, J., Paietta, E., McMannis, J.D., Escobedo, L.V., Sniecinski, I., Rayner, A.A., Hawkins, M.J., Atkins, M.B., Ciobanu, N. and Ellis, T.M. (1988). Laboratory correlates of adoptive immunotherapy with recombinant interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells in humans. *Cancer Res* **48**, 4409-4416.
- 2) Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z. and Rosenberg, S.A. (1982). 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.
- 3) Grimm, E.A., Ramsey, K.M., Mazumder, A., Wilson, D.J., Djeu, J.Y. and Rosenberg, S.A. (1983). Lymphokine-activated killer cell phenomenon II.: Precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory cytotoxic thymus-derived lymphocytes. *J Exp Med* **157**, 884-897.
- 4) Grimm, E.A., Robb, R.J., Roth, J.A., Neckers, L.M., Lachman, L.B., Wilson, D.J. and Rosenberg, S.A. (1983). Lymphokine-activated killer cell phenomenon III.: Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. *J Exp Med* **158**, 1356-1361.
- 5) Itoh, K., Tilden, A.B. and Balch, C.M. (1986). Lysis of human solid tumor cells by lymphokine-activated natural killer cells. *J Immunol* **136**, 3910-3915.
- 6) Itoh, K., Tilden, A.B., Kumagai, K. and Balch, C.M. (1985). Leu-11+ lymphocytes with natural killer (NK) activity are precursors of recombinant interleukin 2 (rIL-2)-induced activated killer (AK) cells. *J Im-*

- munol **134**, 802-807.
- 7) Klein,E.,Klein,G.,Nadkarni,J.S.,Nadkarni,J.J.,Wigzell,H.and Clifford,P.(1968). Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer Res* **28**, 1300-1310.
 - 8) Melder,R.J.,Whiteside,T.L.,Vujanovic, N.L.,Hiserodt,J.C.and Herberman,R.B.(1988). A new approach to generating antitumor effectors for adoptive immunotherapy using human adherent lymphokine-activated killer cells. *Cancer Res* **48**, 3461-3469.
 - 9) Merluzzi,V.J.(1985). Comparison of murine lymphokine-activated killer cells,natural killer cells, and cytotoxic T lymphocytes. *Cell Immunol* **95**, 95-104.
 - 10) Mukherji,B.,Guha,A.,Loomis,R.and Ergin,M.T.(1987). Cell-mediated amplification and down regulation of cytotoxic immune response against autologous human cancer. *J Immunol* **138**, 1987-1991.
 - 11) Muul,L.M.,Director,E.P.,Hyatt,C.L.and Rosenberg,S.A.(1986). Large scale production of human lymphokine activated killer cells for use in adoptive immunotherapy. *J Immunol Methods* **88**, 265-275.
 - 12) Nakamura,H.,Ishiguro,K.and Mori,T.(1988). Different immune functions of peripheral blood,regional lymph node,and tumor infiltrating lymphocytes in lung cancer patient. *Cancer* **62**, 2489-2497.
 - 13) Nii,A.,Sone,S.,Utsugi,T.,Yanagawa,H.and Ogura,T.(1988). Up-and down-regulation of human lymphokine (IL-2)-activated killer cell induction by monocytes, depending on their functional state. *Int J Cancer* **41**, 33-40.
 - 14) Ortaldo,J.R.,Mason,A.and Overton,R.(1986). Lymphokine-activated killer cells analysis of progenitors and effectors.*J Exp Med* **164**, 1193-1205.
 - 15) Rabinowich,H.,Cohen,R.,Bruderman,I.,Steiner,Z.and Klajman,A.(1987). Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors:Lysis of autologous human tumor cells by cultured infiltrating lymphocytes.*Cancer Res* **47**, 173-177.
 - 16) Rosenberg,S.A.,Lotze,M.T.,Mull,L.,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.and White,D.E.(1987). 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.
 - 17) 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.and Reichert,C.M.(1985). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patient with metastatic cancer. *N Engl J Med* **313**, 1485-1492.
 - 18) Rosenberg,S.A.,Spiess,P.and Lafreniere,R.(1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* **233**, 1318-1321.
 - 19) Sawada,H.,Abo,T.,Sugawara,S.and Kumagai,K.(1988). Prerequisite for the induction of lymphokine-activated killer cells from T lymphocytes. *J Immunol* **140**, 3668-3673.
 - 20) Silvennoinen,O.,Vakkila,J.and Hurme,M.(1988). Accessory cells,dendritic cells,or monocytes,are required for the lymphokine-activated killer cell induction from resting T cell but not from natural killer cell precursors. *J Immunol* **141**, 1404-1409.
 - 21) Sone,S.,Utsugi,T.,Nii,A.and Ogura,T.(1987).Effectors of human alveolar macrophages on the induction of lymphokine (IL-2)-activated killer cells. *J Immunol* **139**, 29-34.
 - 22) 鷹尾博司, 佐治重豊, 杉山保幸, 立花 進, 五島秀行, 森田敏弘, 坂田一記(1988). Recombinant IL-2を用いた各種リンパ球活性化細

- 胞誘導に関する基礎的研究. 日本外科学会雑誌 **89**, 646-656.
- 23) Vanky, F., Peterffy, A., Book, k., Willems, J., Klein, E. and Klein, G. (1983). Correlation between lymphocyte - mediated auto - tumor reactivities and the clinical course. II. Evaluation of 69 patients with lung carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* **16**, 17-22.
- 24) Vanky, F., Willems, J., Kreicbergs, A., Aparisi, T., Andreen, M., Brostrom, L. A., Nilsson, U., Klein, E. and Klein, G. (1983). Correlation between lymphocyte - mediated auto - tumor reactivities and clinical course. I. Evaluation of 46 patients with sarcoma. *Cancer Immunol Immunother* **16**, 11-16.
- 25) Yamaki, T., Ibayashi, Y., Nakamura, T., Shijubo, N., Daibo, M., Kawahara, T. and Hashi, K. (1988). Immunotherapy of solid tumor by intratumoral infusion of lymphokine - activated killer cells. *Gann* **79**, 903-908.