

# 脾細胞より誘導した Activated Macrophage と Lymphokine-Activated Killer Cell との 併用による抗腫瘍効果について

—マウスモデルを用いた検討—

奈良県立医科大学第1外科学教室

山 本 克 彦

## SYNERGISTIC ANTITUMOR EFFECTS OF COMBINATION IMMUNOTHERAPY WITH ACTIVATED MACROPHAGE AND LYMPHOKINE-ACTIVATED KILLER CELL IN THE TREATMENT OF ESTABLISHED MURINE CANCER MODEL

KATSUHIKO YAMANOTO

First Department of Surgery, Nara Medical University

Received March 29, 1989

*Summary:* Lymphokine-activated killer cell (LAK cell) is induced from peripheral blood lymphocytes or splenocytes by coincubation with interleukin-2 (IL-2), and macrophage is activated in vitro by MAF including interferon- $\gamma$  etc. They have cytotoxic effects on various malignant cells nonspecifically.

Recently, many reports have indicated that adoptive immunotherapy (AIT) using effector cells, especially LAK cell, is effective for tumor bearing hosts, but reports concerning AIT combined with activated macrophage and LAK cell are few.

In the current study, we investigated the synergistic cytotoxic effect on the X5563 plasmacytoma of the combination of activated macrophage and LAK cell from murine splenocytes.

In vivo antitumor effect on tumor growth after AIT showed that the combination group of activated macrophage and LAK cell is most effective of all groups: activated macrophage group, LAK group and splenocyte group. Also, Winn assay showed the same.

In vitro cytotoxic assay showed that the combination group is more effective than the other groups, but not significantly.

In the mortality assay of metastatic models, the combination group showed the best survival rate.

So, combination AIT using activated macrophage and LAK cell can be expected to exert synergistic cytotoxicity in vivo.

## Index Terms

LAK cell, activated macrophage, adoptive immunotherapy, synergistic effect, Con A.sup.

## I. 緒 言

近年, Interleukin 2 (以下 IL-2) を用いて末梢血液中リンパ球や脾細胞から誘導した Lymphokine-Activated Killer Cell (以下 LAK 細胞) の動物実験および臨床応用における殺腫瘍効果が報告され, また, 種々の活性化物質を用いて誘導した活性化マクロファージ (Activated Macrophage: 以下 A-M $\phi$ ) にも殺腫瘍効果のあることが知られている。

これらの効果細胞を用いて, 临床上, 切除不能な遠隔転移を有する末期癌症例に対し養子免疫療法 (Adoptive Immunotherapy: 以下 AIT) を施行し, 有効であったと報告されている。しかしながら, 十分な量の効果細胞を用いないと満足のできる効果は得られていない。そこで, 著者らは脾を用いることによって大量の細胞を得, そのうち非付着性細胞より LAK 細胞, また付着性細胞より A-M $\phi$  という 2 種類の効果細胞を誘導し, AIT に利用することを考えた。

本研究ではマウスモデル系を用いて, マウス脾細胞から LAK 細胞と A-M $\phi$  を誘導し, 2 種類の効果細胞の併用による抗腫瘍効果について, それぞれの単独群と比較検討した。

## II. 実験方法

## 1) 実験動物

実験動物としては日本チャールズ・リバー研究所より購入した雌性 7~9 週齢の C3H/HeN マウス (平均体重 20g); および雌性 5~6 週齢の BALB/c マウス (平均体重 20g) を用いた。

## 2) 実験腫瘍

標的腫瘍細胞としては C3H/HeN マウス由来で腹腔内で継代された X5563 形質細胞腫細胞 (以下 X5563) と, 同じく同系由来で腹腔内で継代された MH134 肝癌細胞 (以下 MH134) を用いた。これらはともに Natural Killer Cell (以下 NK 細胞) に抵抗性の腫瘍である。

## 3) 細胞浮遊培養用完全培地

細胞培養の完全培地には RPMI 1640 溶液にペーリンガーマンハイム社より購入した Fetal calf serum (FCS: Lot No. 67816702) を 10% になるように添加し, さらに

硫酸ストレプトマイシン (SM) 0.01 mg/ml およびアンピシリンナトリウム (ABPC) 0.01 mg/ml を加えたものを用いた。

4) M $\phi$  活性化物質 (Con A 刺激上清液)

M $\phi$  を活性化する物質として, 既報<sup>1)</sup>のごとく作成した上清液を用いた。すなわち, 無菌的に採取した BALB/c マウスの胸腺および脾をホモジュナイザーを用いて単細胞化し, Hanks' balanced salt solution (HBSS) で 2 回洗浄した後, フェルマシア社製 Concanavarin A (Con A, Lot No. 1B-30189) を 5 $\mu$ g/ml の濃度で加えた完全培地で 5 $\times 10^6$ /ml の濃度に調節し, 37 $^{\circ}$ C $\cdot$ 5%CO<sub>2</sub> の条件下で 48 時間培養後に遠心分離し, 細胞成分を除いた上清液を用いた。この上清中には interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) などをはじめ種々の M $\phi$  activating factor (MAF) が含まれることが知られている<sup>2)</sup>。

## 5) 効果細胞

抗腫瘍効果を有する細胞としては次の 2 種類の細胞を用いた。

(1) LAK 細胞: 無菌的に摘出した C3H/HeN マウスの脾を前述のように単細胞化し, 脾細胞を 5 $\times 10^6$ /ml の濃度に調整する。37 $^{\circ}$ C $\cdot$ 5% CO<sub>2</sub> の条件下 2 時間シャーレで培養し, 浮遊している非付着性細胞を集め, 武田薬品工業 K.K. より提供を受けた TGP-3 (recombinant IL-2: rIL-2, Lot No. H-609-036) を 5 U/ml の濃度になるように加えた完全培地で 72 時間培養し, LAK 細胞を誘導した。

(2) A-M $\phi$ : LAK 細胞と同様にして得た C3H/HeN マウスの脾細胞のうち付着性細胞を採集し, 完全培地で 2 倍希釈した Con A 刺激上清液中で 37 $^{\circ}$ C $\cdot$ 5% CO<sub>2</sub> の条件下において 12 時間培養し, A-M $\phi$  を誘導した。

## 6) コントロール用細胞

in vivo における実験の際, 担癌マウスに移入されたリンパ球と M $\phi$  が生体内において相互作用により抗腫瘍効果に影響を与えることが考えられる。そこで, 併用による相互作用が各群同じ条件とするために, コントロール群および単独群には活性化されていない細胞として以下の 3 つのコントロール用細胞を併用し, 各群に移入する総細胞数を統一した。

## (1) Splenocytes (SPL): 無処置脾細胞

## (2) Lymphocytes (LYM): 無処置非付着性脾細胞

(3) Normal Mφ (N-Mφ): 無処置着性脾細胞

7) in vivo 腫瘍増大抑制試験

C3H/HeN マウスの背部皮内に X5563 を  $2 \times 10^5/0.01$  ml 接種し, 3 日目に A-Mφ を  $4 \times 10^6/0.5$  ml 尾静脈から移入し, さらに LAK 細胞を A-Mφ 移入 2 日後, つまり腫瘍接種 5 日目に  $2 \times 10^7/0.5$  ml 尾静脈から移入した群を A-COMB GROUP とした. また, 腫瘍接種 3 日目に N-Mφ を  $4 \times 10^6/0.5$  ml, 5 日目に LAK 細胞を  $2 \times 10^7/0.5$  ml 移入した群を A-LAK GROUP, 3 日目に A-Mφ を  $4 \times 10^6/0.5$  ml, 5 日目に LYM を  $2 \times 10^7/0.5$  ml 移入した群を A-A-Mφ GROUP, 腫瘍接種 5 日目に SPL を  $2.4 \times 10^7/0.5$  ml 移入した群を A-SPL GROUP とした. 各群は  $n=8$  とした. それぞれの群への移入細胞数は総計  $2.4 \times 10^7$  に統一した. 各群における腫瘍増大抑制能は背部腫瘍の長径および短径から求めた平均径の経時的な変化で示した. その実験スケジュールは Fig. 1 に示した.

8) Winn assay (腫瘍中和法)

宿主関連性の抗腫瘍効果を検討するために C3H/HeN マウスの背部皮内に X5563  $1 \times 10^5$  を A-Mφ  $2 \times 10^6$  および LAK 細胞  $1 \times 10^7$  とともに混合し 0.1 ml として接種した群を W-COMB GROUP とした. 同様に X5563  $1 \times 10^5$  と N-Mφ  $2 \times 10^6$  および LAK 細胞  $1 \times 10^7$  を用いた群を W-LAK GROUP, X5563  $1 \times 10^5$  と A-Mφ  $2 \times 10^6$  および LYM  $1 \times 10^7$  を用いた群を W-A-Mφ GROUP,

X5563  $1 \times 10^5$  と SPL  $1.2 \times 10^7$  を使用した群を W-SPL GROUP とした. 各群は  $n=8$  とした. 各群における腫瘍中和能は背部腫瘍の長径および短径から求めた平均径の経時的な変化で示した. それぞれの実験群に使用した細胞は Table 1 に示した.

9) 転移モデルにおける抗腫瘍能試験

C3H/HeN マウスの背部皮内に X5563 を  $2 \times 10^6/0.1$  ml 接種し, 10 日目に切除すると残存する転移巢のため切除後約 3 週間で死亡する。この転移モデルに対し, 切除翌日に A-Mφ を  $2 \times 10^7/0.5$  ml, 切除後 3 日目

Table 1. Using cells for tumor neutralizing assay

Group	Using cells	
W-COMB	X5563	$1 \times 10^5$
	A-Mφ	$2 \times 10^6$
	LAK cell	$1 \times 10^7$
W-LAK	X5563	$1 \times 10^5$
	N-Mφ	$2 \times 10^6$
	LAK cell	$1 \times 10^7$
W-A-Mφ	X5563	$1 \times 10^5$
	A-Mφ	$2 \times 10^6$
	LYM	$1 \times 10^7$
W-SPL	X5563	$1 \times 10^5$
	SPL	$1.2 \times 10^7$

GROUP

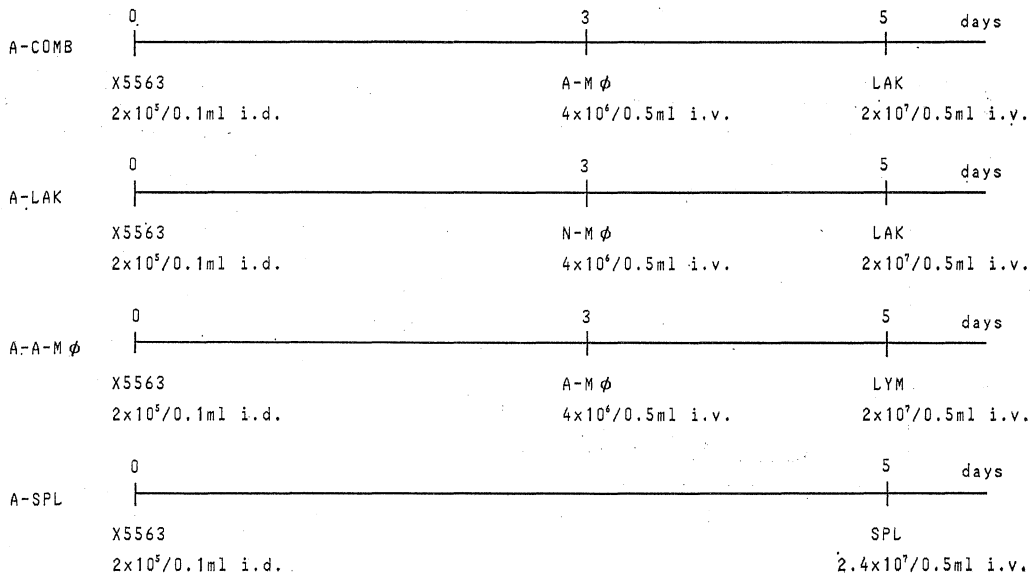


Fig. 1. Experimental design of in vivo antitumor assay.

に LAK 細胞を  $1 \times 10^8/0.5$  ml 移入する群を M-COMB GROUP, 切除翌日に N-M $\phi$  を  $2 \times 10^7/0.5$  ml, 切除 3 日目に LAK 細胞を  $1 \times 10^8/0.5$  ml 移入する群を M-LAK GROUP, 切除翌日に A-M $\phi$  を  $2 \times 10^7/0.5$  ml, 切除 3 日目に LYM を  $1 \times 10^8/0.5$  ml を移入する群を M-A-M $\phi$  GROUP, 切除 3 日目に SPL を  $1.2 \times 10^8/0.5$  ml を移入する群を M-SPL GROUP とした. 各群は  $n=5$  で M-COMB GROUP のみ  $n=6$  とした. 各群における抗腫瘍能は生存期間で比較検討した. その実験スケジュールは Fig. 4 に示した.

10) in vitro 殺腫瘍能試験

LAK 細胞の抗腫瘍能については New England Nuclear Corporation 製の  $\text{Na}_2 \text{}^{51}\text{CrO}_4$  (NEZ-030S) で標識した X5563 とともに培養し, 遊離した  $^{51}\text{Cr}$  放射活性を測定した. すなわち,  $^{51}\text{Cr}$  でラベルした  $1 \times 10^4/0.1$  ml の X5563 を Effector/Target (E/T)=50, および 100 となるように調整した LAK 細胞 0.1 ml と混合し 0.2 ml としてコーニング社製の 96穴丸底培養プレート (#25850) 中で  $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$  の条件下に 4 時間培養し,  $250 \times \text{g}$  で遠沈した後, 上清 0.1 ml を採取して  $\gamma$ シンチレーションカウンターで上清中の放射活性を測定した.

LAK 細胞の % cytotoxicity は次式により算出された.

$$\% \text{ cytotoxicity} = 100 \times$$

$$\frac{\text{実験群遊離放射活性} - \text{自然遊離放射活性}}{\text{最大遊離放射活性} - \text{自然遊離放射活性}}$$

なお, 自然遊離群には調節した腫瘍細胞浮遊液 0.1 ml

に 0.1 ml の完全培地のみを, また最大遊離群には腫瘍細胞浮遊液 0.1 ml に 0.1 ml の 5% sodium dodecyl sulfate (SDS) を加えて放射活性を測定した.

また, A-M $\phi$  の抗腫瘍能は既報のごとく 12 時間で検討した. すなわち, A-M $\phi$  を X5563 と E/T=20 とし て細胞培養用シャーレで完全培地に浮遊させ, 12 時間培養した後, 遠沈し, 全細胞を回収し, トリパンブルー色素排除法にて X5563 の viability を求め, 次式により A-M $\phi$  の % cytotoxicity を算出した.

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{実験群 viability} - \text{コントロール群 viability}}{\text{コントロール群 viability}}$$

なお, コントロール群は X5563 に N-M $\phi$  を加えた群とした.

さらに, 併用による抗腫瘍能の検討は LAK 細胞と A-M $\phi$  のそれぞれ単独群および併用群における 10 時間  $^{51}\text{Cr}$  release assay にておこなった.

11) 統計学的検定

結果の有意差検定には Wilcoxon 検定を用い, 危険率  $P < 0.05$  を有意とした. また, 生存率の検定には Z 検定を用い, 危険率  $P < 0.05$  を有意とした.

III. 成 績

1. in vivo 腫瘍増大抑制試験

in vivo 腫瘍増大抑制試験の結果は, Fig. 2 に示した. A-COMB GROUP は A-SPL GROUP と比べ, 腫瘍接種後 7 日目に以降有意に腫瘍の増大を抑制し, 19 日目には  $9.3 \pm 1.3 \text{ mm}$  vs  $14.6 \pm 1.9 \text{ mm}$  であった (mean

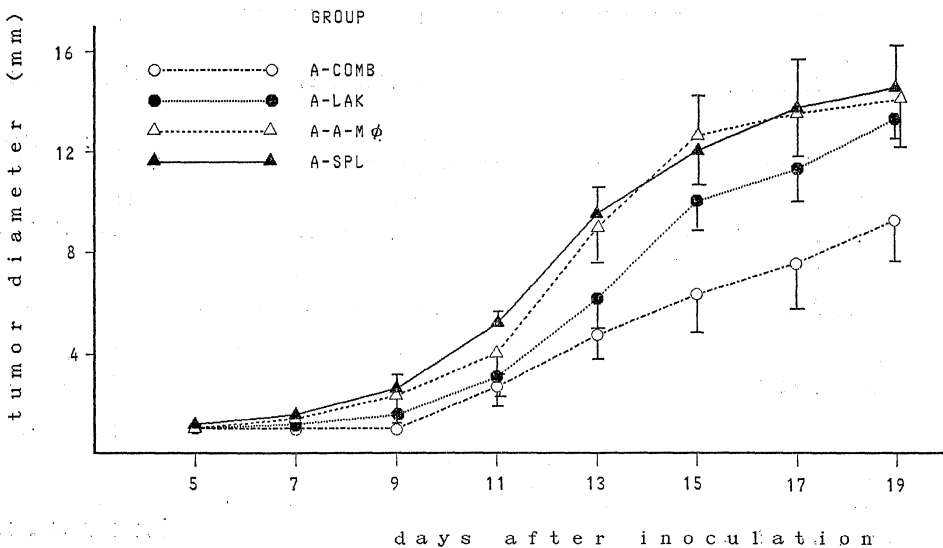


Fig. 2. Antitumor effect on tumor growth after adoptive immunotherapy.

±S.D.,  $P < 0.005$ ). また, A-COMB GROUP は A-LAK GROUP と比べ腫瘍接種9日目 ( $P < 0.025$ ) と13日目 ( $P < 0.05$ ) および15日目を降 ( $P < 0.005$ ) 有意に増大を抑制し19日目には  $9.3 \pm 1.3$  mm vs  $13.4 \pm 0.7$  mm であり, A-A-M $\phi$  GROUP と比べても7日目を降 ( $P < 0.005$ ) 有意に抑制し, 19日目には  $9.3 \pm 1.3$  mm vs  $14.1 \pm 1.9$  mm であった. A-LAK GROUP は A-SPL GROUP と比べ, 腫瘍接種7日目には  $1.2 \pm 0.2$  mm vs  $1.6 \pm 0.3$  mm ( $P < 0.05$ ) で, 9日目から13日目 ( $P < 0.005$ ), および15日目 ( $P < 0.025$ ), 17日目 ( $11.3 \pm 1.1$  mm vs  $13.8 \pm 1.9$  mm,  $P < 0.005$ ) までの期間において有意に腫瘍の増大を抑制していた. さらに, A-LAK GROUP は A-A-M $\phi$  GROUP と比べ腫瘍接種後11日目から17日目までの期間で有意に腫瘍増大を抑制していた (11日目:  $P < 0.05$ , 13日目から15日目:  $P < 0.005$ , 17日目:  $11.3 \pm 1.1$  mm vs  $13.6 \pm 1.7$  mm,  $P < 0.025$ ). A-A-M $\phi$  GROUP は A-SPL GROUP と比べ, 接種後11日目において  $4 \pm 0.8$  mm vs  $5.2 \pm 0.6$  mm で有意差が認められた ( $P < 0.025$ ) が, その他の期間では有意差は認められなかった. なお, 尾静脈からの各細胞の移入によるマウスの死亡は全く認めなかった. また, A-SPL GROUP は腫瘍細胞単独接種群と比べ腫瘍増大に有意差はみられなかった. すなわち, 生体内に非活性のままのリンパ球および M $\phi$  を移入しても抗腫瘍能は認められなかったことになる.

## 2. Winn assay (腫瘍中和法)

Fig. 3 に示すように W-COMB GROUP は W-SPL

GROUP と比べ5日目を降有意に ( $P < 0.005$ ) 腫瘍の増大を抑制し19日目には  $5.2 \pm 0.9$  mm vs  $11.6 \pm 0.9$  mm であった. また, W-LAK GROUP と比べ, 13日目には  $3.3 \pm 0.7$  mm vs  $4.5 \pm 0.8$  mm ( $P < 0.025$ ) および15日目には  $3.9 \pm 0.9$  mm vs  $6.5 \pm 0.8$  mm ( $P < 0.005$ ) で有意に抑制していた. W-A-M $\phi$  GROUP と比べ9日目から13日目に有意差を認めた (9日目:  $P < 0.05$ , 11日目:  $P < 0.025$ , 13日目:  $3.3 \pm 0.7$  mm vs  $5 \pm 1.1$  mm,  $P < 0.005$ ). また, W-LAK GROUP は W-SPL GROUP と比べ5日目を降有意に ( $P < 0.005$ ) 腫瘍の増大を抑制し19日目には  $8.5 \pm 0.8$  mm vs  $11.6 \pm 0.9$  mm であり, W-A-M $\phi$  GROUP と比べ17日目 ( $P < 0.05$ ) と, 19日目には  $8.5 \pm 0.8$  mm vs  $10.5 \pm 1.3$  mm ( $P < 0.005$ ) で有意差を認めた. W-A-M $\phi$  GROUP は W-SPL GROUP と比べ15日目を降有意に腫瘍の増大を抑制していた (15日目:  $P < 0.005$ , 17日目:  $P < 0.025$ , 19日目:  $10.5 \pm 1.3$  mm vs  $11.6 \pm 0.9$  mm,  $P < 0.05$ ).

## 3. 転移モデルにおける抗腫瘍能

各群の生存期間は Kaplan-Meier 法により Fig. 5 に示した. M-SPL GROUP は無処置のものと同様, 腫瘍切除後18日目までにすべて死亡した. Z 検定にて検討した結果, M-COMB GROUP は M-SPL GROUP と比べ19日目を降 ( $P < 0.001$ ), M-LAK GROUP と比べ24日目を降 ( $P < 0.05$ ), M-A-M $\phi$  と比べ26日目を降 ( $P < 0.05$ ) 有意差を認めた. M-SPL GROUP, M-LAK GROUP, M-A-M $\phi$  GROUP の3者間には有意差は認められなかった.

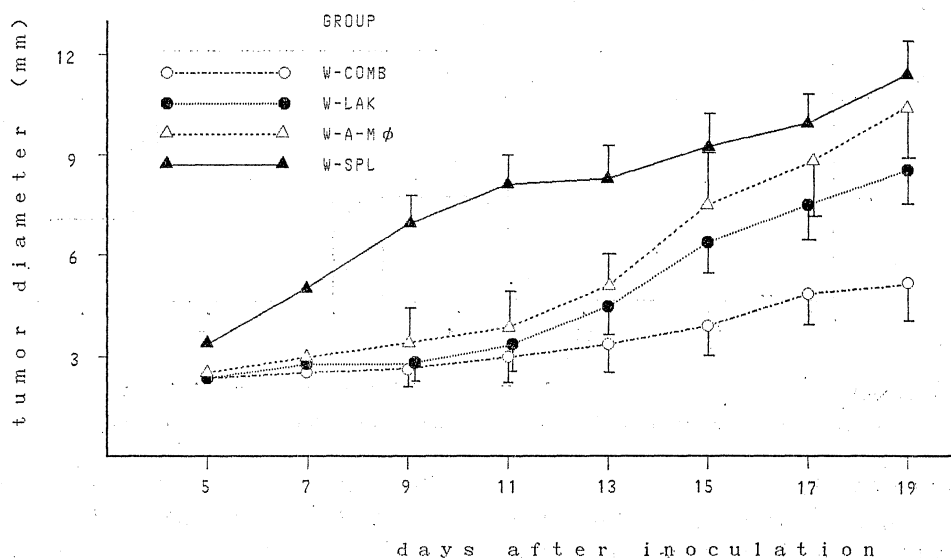


Fig. 3. Tumor neutralizing activity of activated or normal murine splenocytes.

GROUP

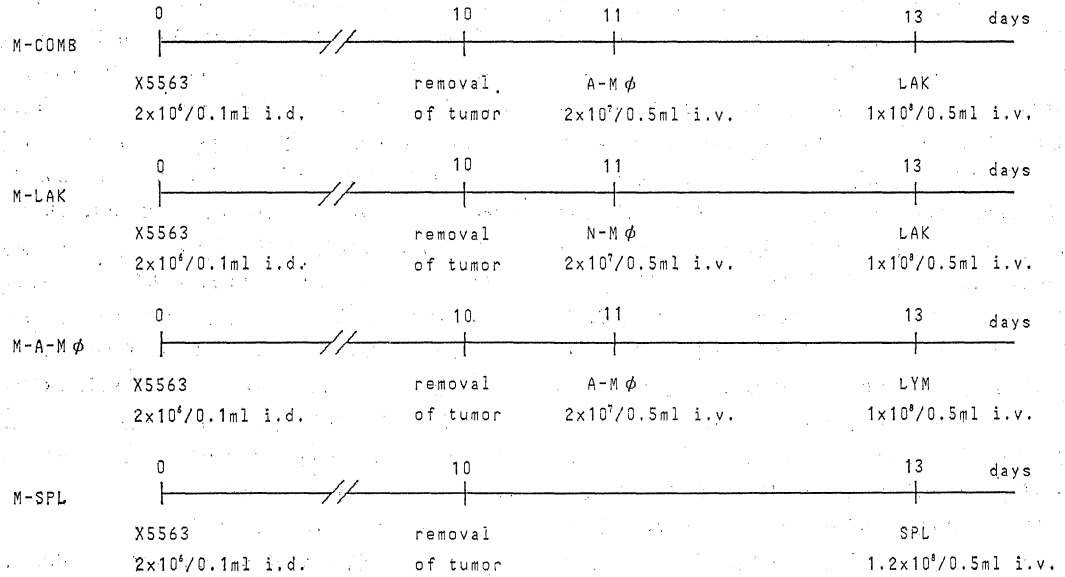


Fig. 4. Experimental design of mortality assay of murine metastatic model.

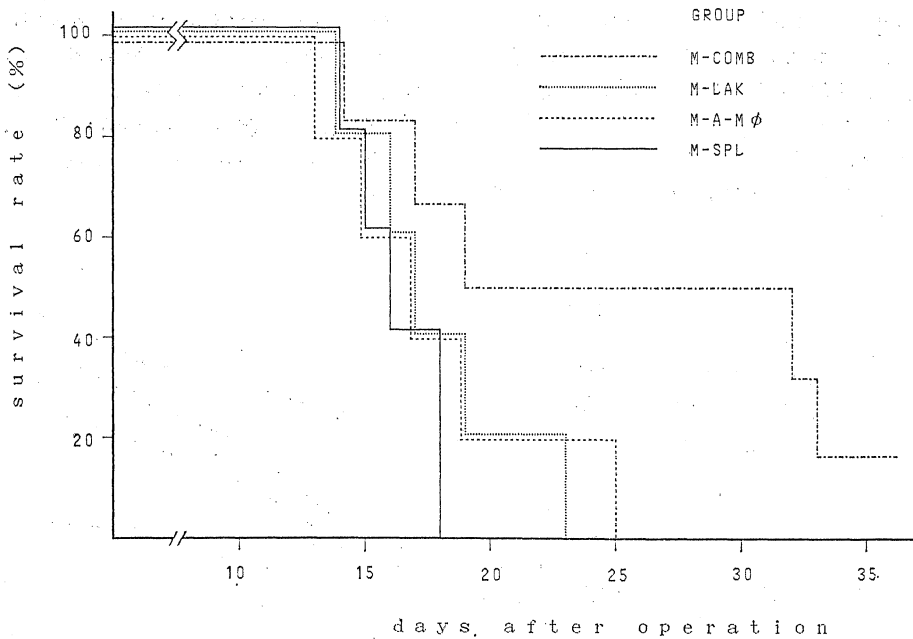


Fig. 5. Survival rates of murine metastatic model after adoptive immunotherapy.

4. in vitro 殺腫瘍能試験

既報<sup>7)</sup>で述べたように LAK 活性を誘導するために必要な培養時間は Fig. 6 に示すように 72 時間までの培養では有意に cytotoxicity は上昇したが、72 時間以上で

は有意差が認められなかった。また、rIL-2 の濃度については Fig. 7 に示すように LAK 活性は濃度依存性に上昇し、5 U/ml 以上でプラトーとなり有意差を認めなかった。そこで、今回の実験において LAK 細胞は

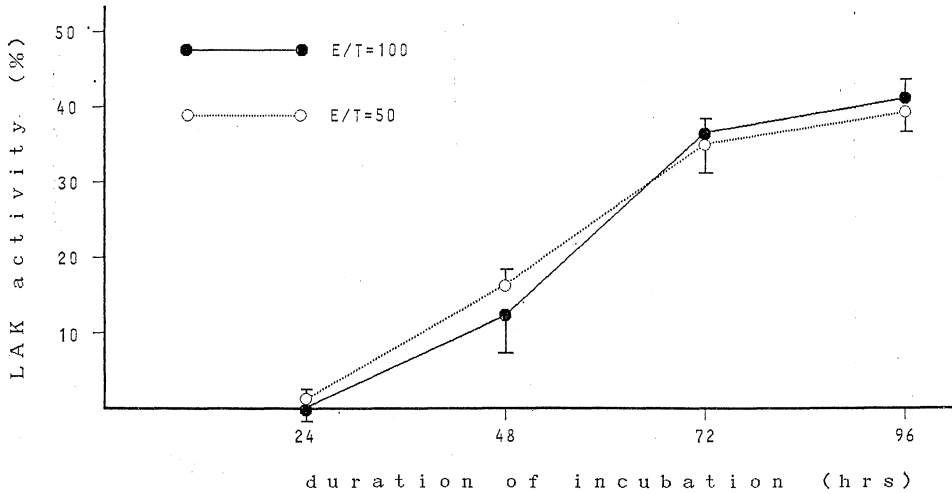


Fig. 6. LAK activity of murine non-adherent splenocyte for duration of incubation. (IL-2 5 U/ml)

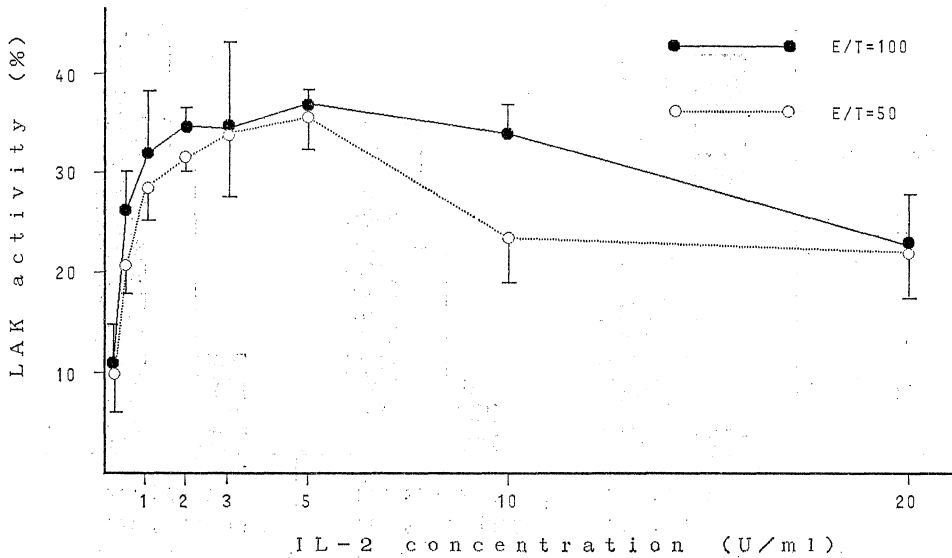


Fig. 7. LAK activity of murine non-adherent splenocyte for IL-2 concentration. (72 hrs incubation)

rIL-2 を 5 U/ml の濃度で、72時間培養して誘導した。SPL および LYM には X5563 に対する殺腫瘍性は認められなかった (% cytotoxicity < 5)。一方、A-Mφ の誘導には Fig. 8 に示すように培養時間とともに cytotoxicity は上昇し、12時間以上では有意差が認められなかった。そこで、今回の実験において A-Mφ の誘導には 12時間培養とした。また、A-Mφ と LAK 細胞の併用による in vitro 殺腫瘍能試験では Fig. 9 に示すように COMB は A-Mφ 単独に比べ抗腫瘍能ははるかに高か

った。また、LAK 単独に比較しても抗腫瘍能が高い傾向が認められた。

#### IV. 考 察

遠隔転移を有する癌患者の治療として、もっとも確実なものは転移巣の切除である。しかし、転移巣の大きさや進展度などによっては切除不能な場合がある。このような症例に対しては従来より化学療法や放射線療法、免疫療法などが行われているが、満足のできる成績は得ら

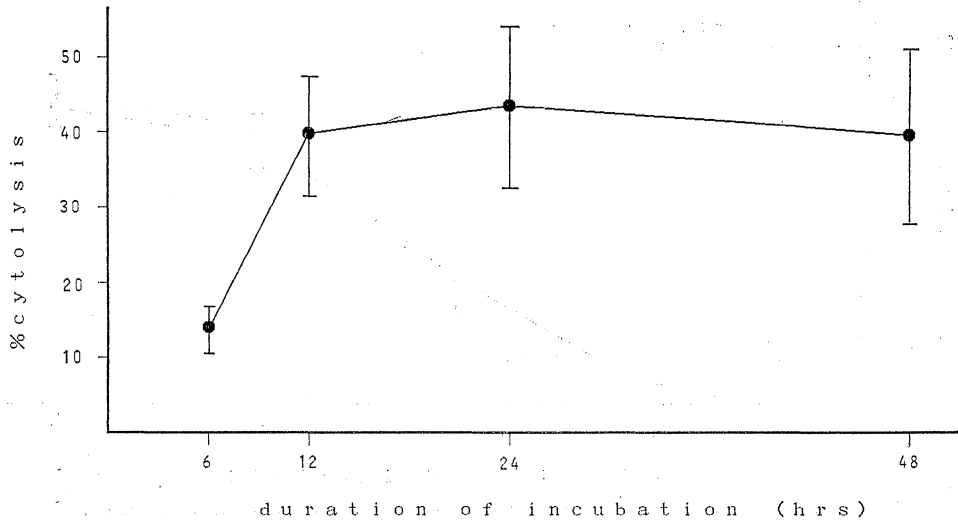


Fig. 8. Cytotoxicity of murine adherent splenocyte for duration of incubation with Con A sup.

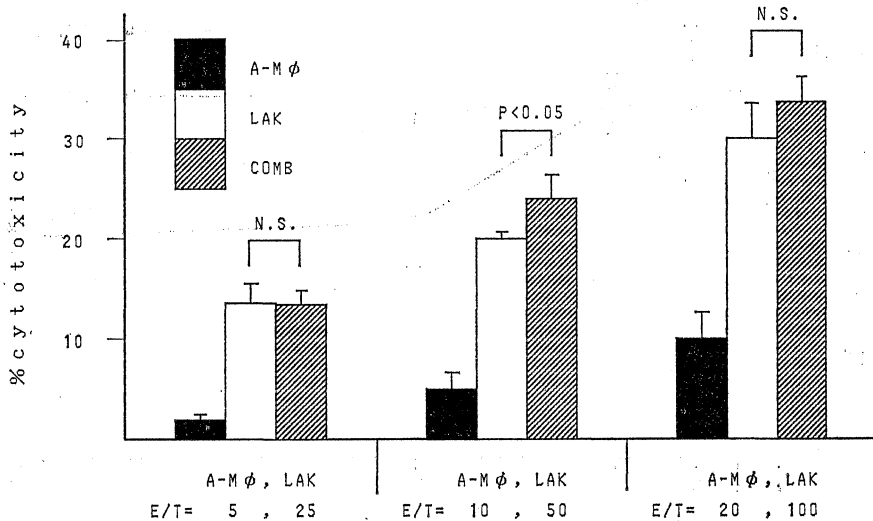


Fig. 9. Synergistic cytotoxicity of A-Mφ and LAK cell from murine splenocyte.

れていない。近年、免疫系細胞を体外で活性化し担癌生体に移入するという養子免疫療法 (Adoptive immunotherapy: AIT) の効果が報告され、前述のような末期癌患者に対しても有効であったと述べられている<sup>50)</sup>。

複雑な相互作用を有する腫瘍免疫の中で、腫瘍免疫の主役は、リンパ球と Mφ であることは多くの研究者の一致した意見である。リンパ球の中で直接腫瘍免疫を担う T cell はそのままでは抗腫瘍効果はほとんど示さず、腫瘍抗原や活性化物質で感作されることによりその抗腫瘍効果を生ずる。本研究においても in vivo 腫瘍増大

抑制試験、腫瘍中和試験、in vivo 殺腫瘍能試験においても SPL GROUP には抗腫瘍効果は認められなかった。一方、NK 細胞は活性化を必要とせずに抗腫瘍効果を有する。しかし、この NK 細胞は担癌生物においては、その抗腫瘍効果は減弱していることが多い。そこで、さらに強い抗腫瘍効果を有する細胞の誘導法が待ち望まれていたところ、1982年 Rosenberg らのグループ<sup>7)</sup>が各種癌患者の末梢血液中のリンパ球を IL-2 の存在下に培養することによって、自己固形癌に対し殺腫瘍能を有する LAK 細胞 (最近ではその前駆細胞が単一でな



いなどの理由により LAK 細胞という表現から LAK 活性を有する細胞群といったほうが適当であるが)の誘導に成功して以来、この LAK 細胞を用いた腫瘍免疫の研究が急速に発展してきた。しかし、LAK 細胞単独による治療ではその有効性についてはなお十分満足の得るところではなく、IL-2 の補充投与などの方法がとられてきた<sup>8)</sup>が、副作用の点で臨床的には限界があった。そこで、十分な量の効果細胞を用いるという点で脾を利用し、さらに A-M $\phi$  と LAK 細胞という 2 種類の細胞を利用することを考えた。これまで、A-M $\phi$  と LAK 細胞の併用効果についての報告は皆無である。そこで、本研究では臨床的に遠隔転移を有する癌患者に対する治療方法として十分量の効果細胞を得るため脾を用いて LAK 細胞と A-M $\phi$  を誘導しそれらの併用による AIT がそれぞれの効果細胞単独によるものより有効であるかどうかを検討するためマウスモデル系を用いた実験をおこなった。

まず、効果細胞の供給源を考えた場合、リンパ球だけなら末梢血液から Leukapheresis などにより採取することが簡単で、かつ実際的であるが治療効果を考えた場合、十分量の効果細胞を得ることは困難であり、また M $\phi$  はその供給源を末梢血液に求めても十分量の細胞を得ることはできない。そこで、両者を得るために脾を用いることを考えた。一般的に脾細胞のうち非付着性細胞はリンパ球系細胞、付着性細胞は M $\phi$  系細胞であるとされている。著者らの経験では 8 週齢の C3H/HeN マウス (体重約 20g) 1 匹の脾からは平均約  $1 \times 10^8$  の細胞が得られ、そのうち約 5/6 が非付着性細胞、残り約 1/6 が付着性細胞であったことから LAK 細胞と A-M $\phi$  の比はすべて 5 : 1 として実験系を組んだ。

まず、リンパ球系細胞からは rIL-2 を用いて抗腫瘍能を有する LAK 細胞を誘導した。IL-2 は以前 T cell growth factor (TCGF) とも呼ばれ<sup>9)</sup>、M $\phi$  もしくは M $\phi$  から産生される IL-1 の存在下に植物性のレクチン (Phytohemagglutinin: PHA, Con A) など種々の活性化物質で T cell を刺激することにより産生される lymphokine の 1 つである。最近、ヒトリンパ球の IL-2 遺伝子を組換え DNA 法を用いて大腸菌内で発現させることにより rIL-2 の大量生産が可能となった<sup>10)</sup>。IL-2 を用いて誘導した LAK 細胞の特徴として Rosenberg らは次のように述べている<sup>11)~13)</sup>。つまり、LAK 細胞は担癌生体および非担癌生体から得た末梢血液中または脾細胞中のリンパ球を IL-2 とともに培養するだけで LAK 活性が誘導でき、従来から殺腫瘍性が認められている NK 細胞に対し抵抗性のある腫瘍に対しても有効

である。また、IL-2 との培養期間は最低 2、3 日必要で、5、6 日で抗腫瘍能は最高となる。本研究においても、LAK 活性の誘導は既報<sup>1)</sup>で述べたように時間とともに細胞の viability が低下するので培養時間を 72 時間とした。その他、前駆細胞と考えられているリンパ球は X 線に感受性で、末梢血液中単核球の非付着性細胞分画のほか、胸腺、骨髄、脾、リンパ節、胸管リンパに存在する。また、LAK 活性誘導には IL-2 が唯一かつ必須の lymphokine であると考えられている<sup>14)</sup>。

動物実験において、担癌マウスの脾細胞から rIL-2 を用いて誘導した LAK 細胞の経静脈投与と間欠的な rIL-2 の補充投与により肺転移<sup>8)</sup>、肝転移<sup>15)</sup>に対する著明な抑制効果と治療による延命効果が明らかにされた<sup>16)</sup>。その LAK 細胞の臨床応用として Rosenberg ら<sup>17)</sup>は癌患者の LAK 細胞と IL-2 の頻回補充投与による AIT をおこなった。つまり、メラノーマ、大腸癌などを含む肺転移を有する進行癌患者を対象に、LAK 細胞および rIL-2 の経静脈投与による治療をおこない、転移性腫瘍の著明な退縮を含む partial regression (PR) や、complete regression (CR) を認めたと報告している。

一方、M $\phi$  もまたグラム陰性桿菌やその菌体内毒素 (Lipopolysaccharide: LPS)、グラム陽性桿菌とそのペプチドグリカンやペプチドグリカン類似の合成物質 (Muramyl dipeptide: MDP)、BCG や Nocardia およびその細胞骨格成分 (Cell wall skeleton: CWS)、連鎖球菌などのグラム陽性球菌、きのこ類由来の多糖体 (PSK、レンチナンなど)、Interferon (INF) 誘起剤やウイルスなどにより抗腫瘍能が誘導され、これらの因子には直接 M $\phi$  を刺激して抗腫瘍能を誘導することが知られている<sup>2)</sup>。また、T cell を PHA や Con A などの植物性のレクチンで刺激することにより T cell から MAF が産生され、この MAF を介しても M $\phi$  に抗腫瘍能を誘導できる<sup>2)</sup>。今回、MAF 活性を有する Con A 刺激上清液を含む培地で付着性脾細胞を培養し抗腫瘍能を有する A-M $\phi$  を誘導した。この誘導した細胞は X5563 を用いた in vitro 殺腫瘍能試験でその活性を確認されている。その in vitro における抗腫瘍能の誘導に要する培養時間は活性化物質により差があるが、概してリンパ球の活性化よりも短く、4~24 時間程度である<sup>18)21)</sup>。本研究においても、A-M $\phi$  の誘導は既報<sup>1)</sup>で述べたように時間とともに細胞の viability が低下するので培養時間を 12 時間とした。MAF は M $\phi$  に IL-1 の合成を促進し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> などの酸素中間体の分泌や食菌、殺菌能を亢進し、抗腫瘍効果を示す<sup>19)</sup>。M $\phi$  の殺腫瘍能の増強は、この M $\phi$  からの H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の分泌能が高まることによると

も考えられている<sup>20)</sup>。以前、奥野ら<sup>21)</sup>はマウスモデル系において、Propionibacterium acnes (P. ances) 菌を用いて体外で M $\phi$  を活性化し抗腫瘍能を誘導し、尾静脈から移入する AIT で A-M $\phi$  の抗腫瘍効果および転移抑制効果を示し、臨床への応用を示唆した。

今回、それぞれの抗腫瘍効果が証明されている LAK 細胞と A-M $\phi$  という 2 種類の細胞を体外で誘導し、in vivo および in vitro で、その併用効果を検討したが、in vitro においては LAK 細胞および A-M $\phi$  の併用による相加・相乗効果は認められなかった。しかし、LAK 細胞のみの cytotoxicity に比べて脾を用いる場合を考慮し LAK 細胞の 1/5 の A-M $\phi$  を加えた場合の cytotoxicity は高い傾向にあった。一方、それにひきかえ in vivo においては両細胞の併用による抗腫瘍効果はそれぞれの単独群と比べ有意差を持って優れていた。これは in vivo においては生体内で両者が互いに影響を及ぼし合い、さらに内因性の効果細胞を誘導したか、また移入した効果細胞や内因性の効果細胞の抗腫瘍効果を増強する物質が産生された可能性がある。

また、腫瘍中和試験は in vitro 殺腫瘍能試験に対して、生体が関与することによる各効果細胞の抗腫瘍効果を比較検討するための実験であるが、in vitro 殺腫瘍能試験の成績と考え合わせると生体を介する腫瘍中和試験の方が、2 種の効果細胞の併用効果は優れていることがうかがえる。つまり、活性化されたそれぞれの細胞は in vitro においてより生体を介した方が抗腫瘍効果に優れると考えられる。それは、in vivo 腫瘍増大抑制試験においてと同様、宿主内因性の効果細胞が誘導されたための効果か、それとも、移入した効果細胞や内因性の効果細胞の抗腫瘍効果を増強する物質が宿主生体から産生された可能性がある。in vivo 殺腫瘍能試験と同様、各効果細胞および生体からの影響がどういふふう反映されているかの詳細な検討は困難であるが、in vivo 殺腫瘍能試験と比較して、その腫瘍増大抑制能における各群の差は腫瘍中和試験の方が著明であった。これは腫瘍中和試験においては、腫瘍が生着する前に各効果細胞が腫瘍と高い E/T 比で直接接触するが、in vivo 殺腫瘍能試験においては生着した腫瘍細胞に対して各効果細胞が経静脈的に移入され接触するという相違によるものかも知れない。

抗腫瘍効果を示す効果細胞を移入する AIT という特殊治療を臨床応用する際、もっとも障害となる問題は副作用である。すでに臨床応用を行っている Rosenberg ら<sup>17)</sup>の経験では切除不能な転移巣を有する癌患者に対し LAK 細胞の全身 (静脈内) 投与と IL-2 の補充静脈内

投与を行った結果、25例中16例に治療開始前の体重の10%の増加を伴う腹水や胸水などの体液貯溜がみられた。しかし、この体液貯溜は IL-2 の補充投与によると考えられ、この補充投与を中止することにより改善した。本実験においては IL-2 の補充投与は行っていないためか、実験マウスに腹水貯溜は認めなかった。臨床的にその他の副作用として発熱、嘔気、嘔吐、悪寒などがみられたが、対処可能であることが確認されている。

これら活性化した細胞の殺腫瘍作用の詳細はまだ不明の部分が多く、その臨床応用も今後さらに研究を要するが、今回の検討によりそれぞれの細胞は生体内に入ってから互いに影響を与え、その抗腫瘍効果を相殺することなく、かえって増強されている傾向がうかがえた。以上のことより AIT には脾を利用し、効果細胞として LAK 細胞および A-M $\phi$  を用いた併用療法がそれぞれの単独療法よりも効果的であり、臨床応用も期待できることが示唆された。

## V. 結 語

複数の大量の効果細胞を用いるため脾を用いたマウスモデル実験系において以下の結果を得た。

(1) in vivo 腫瘍増大抑制能は LAK 細胞および A-M $\phi$  の併用群がそれぞれの単独群と比べ有意に優れていた。

(2) 腫瘍中和能においても in vivo 腫瘍増大抑制能と同様に併用群がそれぞれの単独群と比べ有意に優れていた。

(3) 転移モデルにおいて、LAK 細胞および A-M $\phi$  の併用群はそれぞれの単独群と比べ有意の延命効果が認められた。

(4) in vitro 殺腫瘍能においては併用群が単独群に比べ、% cytotoxicity が高い傾向がみられた。

以上より LAK 細胞と A-M $\phi$  の併用による AIT は生体内での相加・相乗効果が期待される。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った奈良県立医科大学第 1 外科学中野博重教授に深甚なる感謝の意を表するとともに、直接御指導、御援助をいただきました橋本豪博士に心から謝意を表します。また、研究に御協力をいただいた奈良県立医科大学第 1 外科学教室の諸兄に感謝します。なお、本稿の要旨は第 29 回日本消化器外科学会総会において発表した。

本研究の一部は文部省科学研究費 (奨励研究 62770977) によっておこなわれた。

文 献

- 1) 山本克彦, 藤井久男, 佐道三郎, 山本雅敏, 仲川昌之, 渡邊 巖, 安田慎治, 中野博重: マウスにおける活性化マクロファージ (A-M $\phi$ ) と Lymphokine-activated Killer Cell (LAK 細胞) の特徴について. 奈医誌. 39(6): 794-800, 1988.
- 2) Shultz, R.M. and Chirigos, M.A.: Advances in Pharmacology and Chemotherapy. Vol. 17, Academic Press, New York, p 157, 1980.
- 3) Schreiber, R.D., Pace, J.L., Russell, S.W., Altman, A. and Katz, D.H.: Physicochemical and biosynthetic resemblance to  $\gamma$ -interferon. J. Immunol. 131: 826-832, 1983.
- 4) 奥野清隆: 癌の受動免疫療法. 日本臨牀 42 (春季臨時増刊): 1020-1028, 1984.
- 5) Nakano, E., Tada, Y., Ichikawa, Y., Fujioka, H., Matsuda, M., Takaha, M. and Sonoda, T.: Lysis of autologous tumor cells by peripheral blood lymphocytes treated with interleukin 2 in patients with renal cell carcinoma. J. Urol. 137(4): 641-648, 1987.
- 6) Shimizu, K., Okamoto, Y., Miyao, Y., Yamada, M., Ushio, Y., Hayakawa, T., Ikeda, H. and Mogami, H.: Adoptive immunotherapy of human meningeal gliomatosis and carcinomatosis with LAK cells and recombinant interleukin-2. J. Neurosurg. 66(4): 519-521, 1987.
- 7) Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z. and 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.
- 8) Mule, J.J., Shu, S., Schwarz, S.L. and Rosenberg, S.A.: Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. Science 225: 1487-1489, 1984.
- 9) Morgan, D.A., Ruscetti, F.W. and Gallo, R.: Selective in vitro growth of T-lymphocytes from normal human bone marrows. Science 193: 1007-1008, 1976.
- 10) Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R. and Hamuro, J.: Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. Nature 302: 305-310, 1983.
- 11) Grimm, E.A., Ramsey, K.M., Mazumder, A., Wilson, D.J., Djeu, J.Y. and 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.
- 12) Rayner, A.A., Grimm, E.A., Lotze, M.T., Wilson, D.J. and Rosenberg, S.A.: Lymphokine-activated killer (LAK) phenomenon. IV. Lysis by LAK cell clones of fresh human tumor cells from autologous and multiple allogeneic tumors. JNCI 75: 67-75, 1985.
- 13) Rosenberg, S.A.: Immunotherapy of cancer by systemic administration of lymphoid cells plus interleukin 2. J. Biol. Res. Mod. 3: 501-511, 1984.
- 14) Grimm, E.A., Robb, R.J., Roth, R.J., Roth, J.A., Neckers, L.M., Lachman, L.B., Wilson, D.J. and Rosenberg, S.A.: 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, 1983.
- 15) Lafreniere, R. and Rosenberg, S.A.: Successful immunotherapy of murine experimental hepatic metastases with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2. Cancer Res. 45: 3735-3741, 1985.
- 16) Mule, J.J., Ettinghausen, S.E., Spiess, P.J., Shu, S. and Rosenberg, S.A.: Antitumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in vivo: Survival benefit and mechanisms of tumor escape in mice undergoing immunotherapy. Cancer Res. 46: 676-683, 1986.
- 17) Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Leitman, S., Chang, A.E., Ettinghausen, S.E., Matory, Y., Skibber, J.M., Shiloni, E., Vetto, J.T., Seipp, C.A., Simpson, C. and Reichert, C.M.: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. New Eng. J. Med. 313: 1485-1492,

1985.

- 18) **Meltzer, M.S.:** Macrophage activation for tumor cytotoxicity: Characterization of priming and trigger signals during lymphokine activation. *J. Immunol.* **127:** 179-183, 1981.
- 19) **Nakagawa, A., DeSantis, N.M., Nogueira, N. and Nathan, C.F.:** Lymphokines enhance the capacity of human monocytes to secrete reactive oxygen intermediates. *J. Clin. Invest.* **70:** 1042-1048, 1982.
- 20) **稲葉力ヨ:** マクロファージの分化と機能発現. *臨床免疫* **18(3):** 234-245, 1986.
- 21) **Okuno, K., Hashimoto, T., Qian, J.H., Tsuchida, T., Fujiwara, H. and Hamaoka, T.:** Prevention of tumor metastasis after surgical removal of primary tumor by using in vitro activated macrophages. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **15(1):** 17-94, 1985.