同種癌細胞刺激により誘導された自己癌障害性 リンパ球の経動脈的養子免疫療法

吹 上 忠 祐 江 浦 正 郎
猪 川 勉 石 川 哮

論文要旨

われわれは上顎癌2例、舌癌1例の新鮮例に対して養子免疫療法を行った。Leukapheresis によって得たリンパ球を同種の培養癌細胞で刺激し、さらに rIL-2 で活性化して誘導した癌細胞障害性リンパ球 (AlloTLAK) を顎動脈、あるいは舌動脈へ動注した。肉眼的に癌の消失、縮小がみられ、また組織学的にも抗腫瘍効果が認められた。副作用は末梢血好酸球増加と軽度の発熱であった。本治療法は、培養癌細胞を自己癌の代わりに刺激細胞として利用するものであり、普遍的かつ有効なものと考えられる。

Key words: adoptive immunotherapy, recombinant IL-2 (rIL-2), AlloTLAK, LAK

はじめに

Rosenberg らにより悪性腫瘍患者に対して、Recombinant interleukin-2 (rIL-2) で誘導される LAK cell を投与する養子免疫療法が行われるようになって以来、各施設でさかんに試みられている。しかし、大量の LAK cell を必要とするこの治療法は副作用も無視できず、最近 LAK cell に代わるより強力な細胞の誘導、投与方法、投与間隔、他の治療法との併用等の研究がなされている。

われわれは、上顎癌をモデルに自己癌で刺激後 rIL-2 と培養することにより誘導した Autologous tumor and lymphokine activated killer (ATLAK) cell を経動脈的に投与し、著明な抗腫瘍効果を得た¹⁾。しかし、この方法では試験開洞時に得られる自己癌が少量であったり、培養が困難であったりするため、自己癌を利用するには限界があった。そこでわれわれは、自己癌の代わりに培養癌細胞を刺激細胞として利用することを検討した。培養癌細胞刺激により誘導されるキラー細胞は、自己癌に対して自己癌細胞刺激により誘導される ATLAK cell より細胞障害活性は低いが²⁾、LAK cell よりも高いという結果を得た²⁾。

今回、新鮮上顎癌2例、舌癌1例に対して末梢血リンパ球を培養癌細胞で刺激後 rIL-2 と培養することによ

り誘導した Allogeneic tumor and lymphokine activated killer (AlloTLAK) cell を経動脈的に投与し、その抗腫瘍効果を調べた。

対 象

対象症例は65歳男性上顎癌 (T3N0M0, 高分化型扁平上皮癌)、49歳男性上顎癌 (T3N0M0, 低分化型扁平上皮癌)、72歳男性舌癌 (T3N2bM0, 高分化型扁平上皮癌) である。

方 法

1) 顎動脈、舌動脈へのカテーテル挿入、試験開洞

症例1, 2の上顎癌症例に対して、局所麻酔下に耳前部で浅側頭動脈よりアトムカテーテル Fr-3号を挿入した。患側硬口蓋が、インジゴカルミンにて青染するのを確認し、カテーテル先端を顎動脈分岐部まですすめ固定した。症例3の舌癌症例に対しても同様の方法でカテーテル挿入を試みたが、舌動脈分岐部が不明瞭のため、顎下部で皮膚切開を行い、顔面動脈より分岐した舌動脈に直接カテーテルを挿入し固定した。なお、症例1, 2については同時に試験開洞を行い小指頭大の腫瘍組織を採取した。

2) 末梢血リンパ球の採取

Haemonetics V50 モデル (Haemonetics Co Ltd,

熊本大学医学部耳鼻咽喉科学教室

Tadahiro FUKIAGE, Masao EURA, Tsutomu IKAWA, and Takeru ISHIKAWA: Effects of adoptive immunotherapy by intra-arterial infusion of allogeneic tumor sensitized autologous lymphocytes in patients with maxillary and lingual carcinoma

Department of Otolaryngology, School of Medicine, Kumamoto University, Kumamoto

図 1 症例 1 の治療経過

USA) を用い、末梢血より約120~150ml のリンパ球濃度の高い分画を約3時間かけて採取した。さらに Ficoll-Hypaque 比重遠沈法により、リンパ球を分離し、生理食塩水で3回洗滌(1200rpm, 10分間)した。

3) 培養癌細胞

リンパ球に対する刺激細胞として、当教室にて昭和56年に猪川が樹立した上顎癌由来の扁平上皮癌細胞株 KOIMC-011 を使用した³⁾。

4) AlloTLAK cell の誘導

KOIMC-011 をマイトマイシンC処理(100 μ g/ml, 37°C, 30分間)後、リンパ球:癌細胞=50~100:1の割合で混合し、患者と同じ血液型の56°C, 30分間処理凍結血漿を10%の濃度で加えたRPMI 1640(Pc-G 100 units/ml, SM 100 μ g/ml, 25mM Hepesを含む)に、リンパ球数が $2 \sim 4 \times 10^6$ 個/mlとなるように調整し、cultureflask (Falcon 3028) に分注した。3日間インキュベーター(5% CO₂, 37°C)内で静置培養した。3日目に培養液の交換を行い、同時にrIL-2(TGP-3, 武田薬品より恵与)を2U/mlの濃度になるように加えた。以後2~3日おきに培養液の交換及びrIL-2の投与を同様に行った。AlloTLAK cellの回収は培養開始後10日目より培養液交換の際に行った。

5) AlloTLAK cell と LAK cell の細胞障害活性
AlloTLAK cell と rIL-2 のみで誘導した LAK cell の細胞障害活性は KOIMC-011, K562, Daudi を target として E/T 比 20:1 で4時間の⁵¹Cr release assay で行った。

6) AlloTLAK cell 及び rIL-2 の投与方法

回収した AlloTLAK cell を生食にて4回洗滌(1200rpm, 10分間)し、rIL-2 500 U を含む10~20ml

の生食に浮遊させ、カテーテルより約5分間かけてゆっくり動注した。また、rIL-2 500U を連日朝夕2回動脈内カテーテルより動注した。症例1の治療経過を図1に示す。

7) 臨床検査

治療前、治療中、治療後の赤血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン値、白血球数、白血球分画、血液生化学等の検査を行い、さらに末梢血リンパ球の垂分画(OKT-3, 4, 8, 11, OKIa1, Leulla), PPD, SkSd, SuPS による皮内反応をみた。

8) 病理組織検査

症例1では養子免疫療法後、腫瘍の存在部位より組織を採取し、症例2は免疫療法後、上顎全摘出術を、症例3では舌部分切除術を施行し、病理組織学的に観察した。

結 果

1) 細胞障害活性

症例1, 2の自己癌は試験開洞時に採取しこれらに対する LAK cell, AlloTLAK cell の細胞障害活性をみたが、spontaneous release が高く、測定不可能であった。症例3は自己癌の採取を行っていない。

KOIMC-011, K562, Daudi に対する LAK cell, AlloTLAK cell の細胞障害活性は図2に示すようにまず、刺激細胞である KOIMC-011 に対しては3例とも LAK cell よりも AlloTLAK cell の方が高かった。K562 に対し症例2, 3で AlloTLAK cell が LAK cell より高い細胞障害活性を示したが、症例1ではむしろ LAK cell の方であった。Daudi に対しては、3例とも LAK cell と AlloTLAK cell の間に細胞障害活性の差はみられなかった。

Direct killing to various targets

図 2 LAK と AlloTLAK の細胞障害活性の比較

2) 視診および CT による病変部の観察

症例 1 (動注 10 回, 投与細胞総数 4.5×10^9 個) Allo-TLAK 動注 4 回目 (投与数 2.3×10^9 個) に上顎洞側壁の腫瘍の壊死がみられ, 5 回目 (2.6×10^9 個) には側壁から正中部にかけて表面平滑な肉芽組織が洞内をおおうようになった。さらに, 7 回目 (3.3×10^9 個) には後上方眼窩底の腫瘍が消失し, 表面平滑な肉芽組織に置換さ

れ, 9 回目 (3.8×10^9 個) では後篩骨洞に浸潤した腫瘍も消失し, 10 回 (4.5×10^9 個) で終了した。CT では図 3, 4 に示すように, 治療前左上顎洞内に充満し上顎洞後壁を破壊していた腫瘍は治療後消失し, 骨欠損部も肉芽に置換された。

症例 2 (動注 7 回, 投与細胞総数 3.5×10^9 個, AT-LAK 0.76×10^9 個を含む) AlloTLAK 動注 2 回目

図 3 症例 1 の治療前の CT
腫瘍は左上顎洞内に充満し、さらに後壁を破壊し進展している

図 4 症例 1 の治療後の CT
腫瘍は消失し、上顎洞後壁は肉芽に置換されている

図 5 症例 2 の病理組織
変性した腫瘍細胞、巨細胞がみられる

図 6 症例 3 の病理組織
著明なリンパ球浸潤、変性した腫瘍細胞、巨細胞がみられる

(投与数 1.2×10^6 個)より上顎洞側壁の腫瘍の壊死がみられ、表面平滑な肉芽組織がみられるようになった。3回目(1.8×10^6 個)には正中中部にも表面平滑な肉芽がみられるようになった。7回(3.5×10^6 個)動注終了時、上顎洞内の腫瘍は肉眼的に肉芽組織に置換されたが、上顎洞上内方より篩骨洞へ存在する腫瘍の大きさに著変なかった。CT にも、免疫療法前の眼窩内及び篩骨洞への進展した腫瘍は治療後も上顎洞内を除き、その大きさに変化はみられなかった。免疫療法終了1週間後、上顎全摘出術を行ったが、摘出した腫瘍塊は肉眼的に大部分が結合織に置換しており、消化酵素(ディスペーゼ)を用いて癌細胞の分離を試みたがほとんど回収できなかった。

症例 3 (動注 4 回、投与細胞総数 2.9×10^6 個) Allo-TLAK 動注 3 回目(投与数 2.0×10^6 個)に正中中部より腫瘍の縮小がみられ、4 回目(2.9×10^6 個)には治療前長径 55mm であった硬結は 18mm となった。その後カテーテル固定部の感染がおり、動注は 4 回で終了した。免疫療法終了後舌1/3部分切除、左頸部郭清術を行った。

3) 病理学的検索

症例 1 では動注終了後、腫瘍の存在部位より生検を行っ

たが、上皮細胞核にやや不整を認めるものの癌細胞は認めなかった。症例 2 では癌細胞の著明な変性とマクロファージの集合により形成されたと考えられる巨細胞が認められ、周囲へのリンパ球の浸潤は少なくすでに線維化しており、免疫療法後手術までの時間的な経過が長かったことが一因と思われた(図 5)。症例 3 では変性した腫瘍細胞と巨細胞がみられ、その周囲には著明なリンパ球浸潤を認めた(図 6)。このようにいずれの症例においても病理組織学的にも著しい抗腫瘍効果が確認された。

4) 検査成績

血液学的検査では治療中にやや貧血の傾向がみられ、白血球数、リンパ球数は症例 1、3 では増加し、症例 2 では白血球数の減少とリンパ球の増加がみられた。しかし、全般的に大きな変動はなかった。また、モノクローナル抗体によるリンパ球表面マーカーの検索では末梢血リンパ球の亜分画に大きな変動はなかった(表 1)。治療後症例 1 では SkSd の皮内反応が陽転し、症例 2 では SkSd、SuPS が陽陽性になった。症例 3 は皮内反応に変化はなかった。

5) 副作用

表 1 治療前・中・後における血液学的検査成績

○ : リンパ球採取, * : AlloTLAK 投与

表 2 AlloTLAK 投与による副作用

副作用	症例 1	症例 2	症例 3
体重増加	-	-	-
発熱	-	+	-
悪心 嘔吐	-	-	-
全身倦怠感	-	-	-
肝機能異常	-	-	+*
好酸球増加	+(59%)	-	-

*免疫療法後 2 カ月で黄疸が出現
(術中輸血施行例)

症例 1 は著明な末梢血好酸球増加を認めたが、rIL-2 投与中止 7 日目には正常値に戻った。症例 2 で発熱がみられたが、解熱剤（ボルタレンサポ® 50mg）投与にて軽快した。症例 3 では免疫療法終了後、2 カ月経過して肝機能障害を認めたが、術中に輸血を施行しており、これによるものと推定された（表 2）。

考 察

養子免疫療法は LAK を経静脈的に全身投与する方法が一般的であるが、より効果を高める手段として、われわれはより強力な effector cell の誘導と effector cell の腫瘍局所へのより効率的な集積という点に着目した。ところで AlloTLAK は LAK に比べ、刺激細胞である KOIMC-011 に対して、細胞障害活性が高く、また K562, Daudi に対しても十分細胞障害活性がみられた。残念ながら今回自己癌に対する細胞障害活性は測定不能であったが、以前報告したように AlloTLAK も自己癌に対して十分細胞障害活性が誘導されることが証明されている²⁾。また、臨床的に腫瘍の退縮が確認され、組織学的にも腫瘍組織へのリンパ球浸潤とマクロファージによる巨細胞の形成を認めている。AlloTLAK による自己癌の細胞障害が刺激細胞である KOIMC-011 と自己癌における表面抗原の共通性、あるいはある一致した腫瘍関連抗原に基づくものではないかと考えられる。このように同種培養腫瘍細胞を刺激細胞として effector cell を誘導する方法は自己癌を採取しこれを刺激細胞として用いる方法に比べれば、はるかに普遍的である。今後、リンパ球とどのような腫瘍の組み合わせの場合に最も有効に effector cell を誘導できるのか検討していく必要がある。特に effector cell の誘導や細胞障害活性と HLA の関係については今後の課題である。

Effector cell の投与法に関して、静注法では主に肺、

肝への集積が認められ⁴⁾、これらの臓器に腫瘍が存在している場合は有効な手段と考えられる。しかし頭頸部のごとく、静注法では effector cell の集積が肺、肝に比べほとんどない部位では、抗腫瘍効果は期待しがたい。上顎癌症例に対して浅側頭動脈より逆行性にカテーテルを挿入し、顎動脈より effector cell を注入すると、48 時間後も局所に有意に集積していることが確認されており¹⁾、また、Morita ら⁵⁾も腎癌患者に対して、腎動脈より投与した LAK が 48 時間後も腫瘍組織にとどまっていることを示し、十分な数の effector cell を腫瘍組織に集積させるためには、支配動脈からの effector cell の投与が全身的投与よりも有効であるとしている。これらに基づき、われわれは顎動脈あるいは舌動脈より effector cell の動注を行い、効果を得ることができた。副作用に関しても、全身的投与に比べると⁶⁾少なく、理想的投与法と考えられる。

一方、AlloTLAK の投与により腫瘍組織への著しいリンパ球の浸潤がみられたが、これらが AlloTLAK 投与による直接的な反応であるのか、あるいは投与によって何らかの液性因子などの関与した免疫応答の結果であるのか、今後、組織を含めて検討していく必要がある。

また、症例 1, 2 では SkSd, SuPS などに対する皮内反応の陽性化がみられ、AlloTLAK の投与および rIL-2 の投与により、局所のみではなく、全身的な免疫応答の変化が生じたと考えられ、養子免疫療法に伴うこれらの変化が治療効果の一つの指標となりうるのか今後の課題である。

ま と め

上顎癌 2 例、舌癌 1 例の新鮮例に対して leukapheresis を行い、同種の培養癌細胞刺激により誘導した AlloTLAK を動注することにより、以下の結果を得た。

- 1) 上顎癌第 1 例 (T3N0M0) では 4.5×10^6 個の細胞を動注し、肉眼的に腫瘍が消失した。
- 2) 上顎癌第 2 例 (T3N0M0) では 3.5×10^6 個の細胞を動注し、肉眼的、組織学的に抗腫瘍効果がみられた。
- 3) 舌癌症例 (T3N2bM0) では 2.9×10^6 個の細胞を動注し、長径 55mm から 18mm へ硬結が減少し、組織学的にも抗腫瘍効果がみられた。
- 4) 治療後、上顎癌第 1, 2 例において SkSd および SkSd, SuPS に対する皮内反応がそれぞれ陽性、強陽性を示した。
- 5) 副作用は、上顎癌第 1 例で著明な末梢血好酸球増加がみられ、第 2 例で軽度の発熱がみられたが、いずれも重篤なものではなかった。

SUMMARY

Adoptive immunotherapy was applied to 2 maxillary cancer cases and 1 lingual cancer case (squamous cell carcinoma). Peripheral blood lymphocytes obtained through leukapheresis were cultured for 3 days with allogeneic tumor cell line originated maxillary squamous cell carcinoma, and further incubated in recombinant interleukin-2 (rIL-2) to generate allogeneic tumor and lymphokine activated killer (AlloTLAK) cells. AlloTLAK cells were infused directly into the maxillary artery for the maxillary cancer cases and into the lingual artery for the lingual cancer case. Tumor staged as T3 of one maxillary cancer case completely disappeared after infusion of 4.5×10^9 AlloTLAK cells. Objective tumor regression was observed in the other maxillary cancer case after infusion of 2.74×10^9 AlloTLAK and 0.76×10^9 ATLAK cells. After completion of adoptive transfer of these cells, total maxillectomy was performed. Tumor size of lingual cancer was markedly reduced from T3 to T1 in clinical estimation after infusion of 2.9×10^9 AlloTLAK cells. This case underwent surgery to remove 1/3 of the tongue along with radical neck dissection. Surgically resected tissues of maxillary cancer and lingual cancer were histologically examined. They revealed tumor degeneration with infiltration of lymphocytes, scavenger macrophages. Side effects were minor. Such as, a slight fever and blood eosinophilia.

参考文献

- 1) 江浦正郎, 猪川 勉 他: 癌細胞刺激によって誘導された自己癌障害性リンパ球を用いた頭頸部癌治療の研究, 第一報自己癌細胞刺激誘導自己癌障害性リンパ球の経動脈的移入による上顎癌の治療効果. 日耳鼻 91: 2069-2078, 1988.
- 2) 猪川 勉, 石川 哮 他: 癌細胞刺激によって誘導された自己癌障害性リンパ球を用いた頭頸部癌治療の研究, 第二報 同種癌細胞刺激による自己癌障害性リンパ球の誘導. 日耳鼻 91: 2079-2081, 1988.
- 3) 猪川 勉: 頭頸部扁平上皮癌細胞に対する自己リンパ球の細胞障害性の研究. 日耳鼻 84: 1570-1578, 1981.
- 4) Lotze MT, Line BR. et al: The in vivo distribution of autologous human and murine lymphoid cells grown in T cell growth factor (TCGF): Implications for the adoptive immunotherapy of tumors. J Immunol 125: 1487-1493, 1980.
- 5) Morita T, Yonese Y. et al: In vivo distribution of recombinant interleukin-2-activated autologous lymphocytes administered by intra-arterial infusion in patients with renal cell carcinoma. JNCI 78: 441-447, 1987.
- 6) Rosenberg SA, Lotze MT. et al: 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.