OK-432 によりヒト末梢血単核球に誘導される 腫瘍細胞傷害活性に関する研究

久保田英朗・今村 英夫・片野 光男*・黒河 博之
田中 絹子・胡 兆良・香月 武

Studies on OK-432-induced antitumor activity in human peripheral blood mononuclear cells

Eiro KUBOTA・Hideo IMAMURA・Mitsuo KATANO*・Hiroyuki KUROKAWA
Kinuko TANAKA・Hu Zhao-LIANG・Takeshi KATSUKI

Abstract: Antitumor activities of OK-432-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were examined. Killer activity against natural killer (NK) cell-sensitive K562 as well as lymphokine activated killer (LAK) cell-sensitive Daudi and PC3 target cells were detected among PBMC cultured with a low dose (0.0125~0.05 KE/ml) of OK-432. Kinetic analysis of killer activity showed that it reached a plateau level by 48 h of culture. Various freshly isolated tumor cells from oral cancer patients were also lysed by both the autologous and allogeneic OK-432-stimulated PBMC (OK-MC), suggesting that the specificity of the killer was not restricted by HLA and was thus non-specific. Fluorescence activated cell sorter (FACS) analyses showed that CD57⁺/CD25⁺ and CD16⁺/CD25⁺ cells were increased in PBMC after 48-h stimulation with OK-432. The killer activity was further augmented by the addition of rIL-2 at the time of killer assay.

Tumor growth inhibitory factor (TGIF) activity, which we previously reported, was found in the culture supernatant (CSN) of OK-MC from various cancer patients. The titer of TGIF from these patients was high enough, 16~64× of the reciprocal dilution of the CSN, which was almost equivalent to the activity from normal healthy controls.

These results suggest that two kinds of antitumor activities were induced in the OK-432-stimulated PBMC *in vitro*, the one being cell-mediated and the other lymphokine-mediated (TGIF). OK-MC is thus supposed to be effective for adoptive immunotherapy (AIT) in oral cancer patients.

Key words: OK-432-activated mononuclear cell (OK-432活性化単核球), adoptive immunotherapy (養子免疫療法), oral cancer (口腔癌)

緒 言

遺伝子組換え IL-2 (recombinant IL-2, rIL-2) の大

量供給が可能となり、近年 Grimm ら¹⁾が提唱した IL-2 活性化キラー細胞 (lymphokine-activated killer, LAK) を用いた免疫療法が臨床応用され、その有効性が報告されつつある。

佐賀医科大学歯科口腔外科学教室
(主任：香月 武教授)

* 佐賀医科大学外科学教室
(主任：久次武晴教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,

Saga Medical School (Chief: Prof. Takeshi Katsuki)

* Department of Surgery, Saga Medical School
(Chief: Prof. Takeharu Hisatsugu)

受付日：平成2年8月20日

ヒト溶連菌製剤 OK-432 は、種々の抗腫瘍活性を誘導する BRM (biological response modifier)²⁾として、わが国で各科領域の悪性腫瘍の治療に用いられている。特に細胞性の免疫機構の賦活作用として、マクロファージ (Mφ)³⁾、ナチュラルキラー (NK) 細胞⁴⁾、LAK 細胞⁵⁾、T 細胞⁶⁾などを活性化させる事実が報告されている。われわれは、すでに OK-432 で末梢血単核球 (PBMC) を刺激すると、培養早期 (48時間) に有効なキラー細胞活性が誘導できることを見出し、これら OK-432 活性化単核球 (OK-MC) を使った養子免疫療法 (adoptive immunotherapy, AIT) を行うべく検討を重ねている⁷⁾。本研究では、OK-432 により PBMC 中に誘導されるキラー細胞ならびに抗腫瘍性液性因子の特性につき基礎的に検討した。

実験材料および方法

1. 培養方法

健康人あるいは口腔癌患者から末梢血をヘパリン採血し、Ficoll-Conray 比重遠心分離法 (Histopaque 1.077, シグマ社) にて単核球画分を得、Hanks' balanced salt solution (HBSS 液) で3回洗浄し PBMC を得た。PBMC は $2 \times 10^6/\text{ml}$ の細胞濃度で、血清無添加 RPMI 1640 培地中で培養した。OK-432は、通常 0.025 KE/ml で、rIL-2 は 10 JRU/ml の最終濃度で添加した。OK-432 は中外製薬⁸⁾より、rIL-2 (TGP-3) は武田薬品工業⁹⁾より提供された。

2. 細胞株

NK 感受性細胞である K562 (慢性骨髄性白血病由来細胞株)、Daudi (パーキットリンパ腫由来細胞株)、PC3 (ヒト肺癌細胞株)、MK-1 (ヒト乳癌細胞株) を実験に供した。これら細胞株は 5% CO₂, 37°C インキュベーター内で 10% 牛胎児血清 (FCS) 加、RPMI 1640 培地で培養された。

3. 新鮮腫瘍細胞の調整

生検により 5 × 5 mm 大の腫瘍塊を得、これをピンセットとハサミを用いて無菌的に細片とし、0.2% コラゲナーゼと 0.1% デオキシリボスクレアーゼ (シグマ社) を含む HBSS 液に浮遊させ、37°C で2時間処理した。処理後、ビペッティングにより単細胞浮遊液を得、3回洗浄して実験に供した。

4. キラー細胞活性の検出

PBMC は $2 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、24ウェルリンブロープレートにまき、前述の OK-432 または rIL-2 を添加して、5% CO₂, 37°C 条件下で培養し活性化リンパ球を誘導した⁷⁾。

標的細胞は、⁵¹Cr(Na₂⁵¹CrO₄, New England Nuclear) 100 μCi を 0.5 ml の標的細胞浮遊液に添加し、37°C で1時間標識した後、3回 HBSS 液で洗浄し、10

%FCS, $5 \times 10^{-6}\text{M}$ 2-mercaptoethanol (2 ME), および 10 mM HEPES 添加 RPMI 1640 液で 1×10^4 個/25 μl/ウェルとなるように浮遊し調整した。単層培養細胞である PC3 については、0.25% トリプシン (シグマ社) を含む PBS で処理後、単細胞浮遊液とし同様に標識した。一定期間培養した PBMC は回収後、エフェクター細胞として濃度を変えて 50 μl ずつ 96ウェル平底マイクロプレート (ファルコン社) の各ウェルに添加した。その後、標的細胞を加え 5% CO₂, 37°C の条件下で12時間反応させた。

反応終了後、200 μl の HBSS 液を各ウェルに加え、1,200 rpm で6分間プレートを遠心後、その培養上清を 100 μl ずつ採取し、放出された ⁵¹Cr の放射活性をガンマカウンターにて測定した。細胞傷害活性は次式を用いて算定した⁸⁾。

細胞障害活性 (% cytotoxicity) = 実験遊離 (experimental release) - 自然遊離 (spontaneous release) / 最大とり込み (total incorporated) - 自然遊離 (spontaneous release) × 100。自然遊離はエフェクター細胞の代わりに培養液のみを添加し、最大とり込みは標的細胞のみの放射活性を測定した。すべての測定は duplicate で行い、エフェクター細胞と標的細胞の比 (E:T ratio) を少なくとも3段階変えて測定した。また、同一の実験を2度以上くり返し行い、その中の1つを実験結果として図、表に表した。自然遊離はいずれの実験においても20%以内にとどまった。

5. リンパ球細胞表面抗原の解析

1×10^6 個の PBMC をガラスチューブ (コーニング社) に分注し遠心後、ベレットにあらかじめ適当な濃度に希釈した FITC 標識モノクローナル抗体 (ベクトンディッキンソン社) を 10 μl ずつ加え混和し、4°C で30分間反応させた。PBS で3回洗浄後、フローサイトメーター (FACS, Ortho Spectrum III) にて測定した。Two color 解析は赤色蛍光である PE (phyco-erythrin) 標識抗体を2色目として用い同時に染色した。測定は、前方散乱光および、側方散乱光の2つのパラメーターによりリンパ球領域を設定し、1検体につき 5×10^3 個以上の細胞を検出し陽性率を算出した。

6. OK-432 によって誘導される抗腫瘍性サイトカイン (TGIF) 活性の検出

ヒト腺癌細胞 MK-1 を 5×10^3 /ウェル/50 μl の細胞濃度で96ウェルマイクロタイタープレートにまき、段階希釈した培養上清を 50 μl 加え、40時間後に培養上清無添加のコントロールと生細胞数を比較し、50%の腫瘍細胞増殖抑制率を示す上清の希釈倍数の逆数を TGIF 力価として表した。正常人から得られた PBMC を OK-432 で 48 h 刺激した培養上清中には、通常16~64倍の TGIF 活性が認められる。

結 果

1. OK-432 によって PBMC に誘導されるキラー細胞活性

ヒト PBMC を種々の濃度の (0.0125~1.0 KE/ml) OK-432 を加えた培地中で培養し、2 日後に、K562 ま

図 1 末梢血単核球から種々の濃度の OK-432 より誘導されるキラー細胞活性

図 2 OK-432 刺激により出現するキラー細胞活性の経時的変動

たは PC3 を標的細胞としてキラー細胞活性を測定したところ、図 1 のように0.0125~0.05 KE/ml の低濃度の OK-432 で効率よくキラー細胞活性が誘導できることがわかった。また、この際 NK 感受性の K562, LAK 感受性の PC3 いずれも傷害を受けることがわかった。さらに、細胞傷害活性の測定時に高濃度(0.5 KE/ml 以上)の OK-432 が培養液中に残存するとその直接的な細胞毒性により標的細胞が傷害されやすいことがわかった。したがって 以後の 実験では、OK-432 の濃度を 0.025 KE/ml に設定した。

次に、0.025 KE/ml の OK-432 で誘導されるキラー

表 2 OK-432 または rIL-2 刺激末梢血単核球の two color フローサイトメトリーによる細胞表面抗原の解析

クラスター	陽性細胞率 (%)		
	None	OK-432	rIL-2
CD57/CD25	-/-	65.1	58.8
	+/-	33.2	28.3
	+/+	0.3	5.0
	-/+	1.4	7.0
CD16/CD25	-/-	81.9	76.6
	+/-	16.4	9.8
	+/+	0.1	2.1
	-/+	1.5	10.6
CD57/CD3	-/-	19.2	20.3
	+/-	15.2	16.0
	+/+	81.4	17.2
	-/+	47.3	46.6
CD4/CD8	-/-	47.6	49.6
	+/-	19.4	17.9
	+/+	1.2	0.8
	-/+	31.8	31.8

表 1 末梢血単核球の OK-432 または rIL-2 刺激による細胞表面抗原の変化

クラスター	陽性細胞率 (%)						
	Exp. 1	None	OK-432	Exp. 2	None	OK-432	rIL-2
CD3		50.6	54.3		68.9	64.5	64.9
CD4		35.0	39.3		24.3	23.6	25.1
CD8		16.1	24.4		28.7	33.7	34.5
CD57 (HNK-1)		19.4	37.7		22.2	25.5	27.2
CD11 (OKM1)		15.0	17.6		—	—	—
CD16 (Leu 11a)		12.2	15.6		—	—	—
IL-2R		3.2	16.6		—	—	—
OKM5		—	—		4.8	1.1	1.0

図3 末梢血単核球のOK-432刺激によるLeu 7 (CD57), IL-2R (CD25) 抗原の発現. Aで示したリンパ球画分(破線で囲んだ細胞群)をB, Cに示すようにtwo color解析した. DではAよりもやや大型のリンパ球画分を選択し(破線で囲んだ細胞群), これらをE, Fに示すようにtwo color解析した.

活性の経時的変動を検索したところ(図2), 培養12時間目頃よりキラー活性は出現し始め, 48時間でプラトーに達した.

2. 細胞表面抗原の検索

PBMCをOK-432またはrIL-2で48時間刺激し, それぞれのリンパ球表面抗原をFACSにて解析した. その結果, OK-432刺激でCD57⁺(Leu 7⁺), CD25⁺(IL-2レセプター, IL-2R⁺)細胞の割合が増加した(表1). CD16陽性細胞の増加はCD57⁺細胞ほど著明ではなく, 後述するIL-2刺激で誘導されるLAK細胞とは若干異なった細胞表面抗原陽性細胞の増加を認めた.

さらにtwo color染色の結果, OK-432刺激ではIL-2R陽性のNK細胞(CD57⁺/CD25⁺), CD16⁺/CD25⁺のLAK様細胞, またIL-2刺激ではCD57⁺/CD25⁺細胞, T細胞マーカー(CD3)陽性のNK細胞(CD57⁺/CD3⁺), CD16⁺/CD25⁺細胞の増加が認められた(表2). さらに, OK-MC中で前方散乱光のパラメーターが大きく, やや細胞の大きさが大きい, 活性化された細胞と思われる細胞域を解析してみると, 小型リンパ球分

画(図3C)にみられたと同様にそれらにTac抗原(IL-2R)ならびにCD57陽性細胞が高率に存在していた(図3F).

3. 口腔癌新鮮腫瘍細胞に対するOK-MCの細胞傷害活性

4名の口腔癌患者(扁平上皮癌3名, 歯源性明細胞癌1名)より得た新鮮腫瘍細胞を標的細胞として, 自己または同種異型(*印)のPBMCによる細胞傷害活性を測定した(表3). いずれのエフェクター細胞も, 非刺激時よりもOK-432とともに48時間培養すると, 細胞傷害活性が増強された.

以上の結果からOK-MCは, 新鮮腫瘍細胞をも傷害しうる事が示された.

4. OK-432によって誘導される抗腫瘍性サイトカイン

*In vivo*ならびに*in vitro*の実験で, OK-432刺激により, Interferon α , γ (IFN α , IFN γ)⁹⁾, tumor necrosis factor (TNF)¹⁰⁾, natural killer activating factor (NKAF)¹¹⁾などの種々のサイトカインが検出されるこ

表 3 口腔癌患者末梢血単核球の OK-432 刺激による新鮮腫瘍細胞傷害活性の増強

症例	診 断	組織診断	細胞傷害活性 (%)	
			培養液のみ	OK-432 添加
1	舌 癌	扁平上皮癌	-9.7	12.7
2	歯肉癌	歯源性明細胞癌	-1.2	3.9
3	歯肉癌	歯源性明細胞癌	-0.8	7.7*
4	口底癌	扁平上皮癌	15.2	30.0
5	口底癌	扁平上皮癌	12.3	20.0*
6	硬口蓋癌	扁平上皮癌	32.0	70.5*

*印は同種異型（他人）の PBMC を OK-432 で刺激して得られた細胞傷害活性を示す。

表 4 口腔癌患者末梢血単核球の OK-432 刺激培養上清中に検出される腫瘍増殖抑制因子 (TGIF) 活性

症例	診 断	化学療法および放射線療法	50%腫瘍増殖抑制率
1	上顎歯肉癌	+	16×
2	上顎歯肉癌	+	16×
3	下顎歯肉癌	+	16×
4	下顎歯肉癌	+	16×
5	舌 癌	+	64×
6	舌 癌	+	16×
7	口底癌	+	8～16×
8	口底癌	+	32×
9	上顎洞癌	+	2～4×
10	口底癌	-	16～32×
11	咽頭癌の頸部リンパ節転移	-	16×

表 5 OK-432 で誘導されるキラー細胞活性の IL-2 による増強効果

rIL-2 添加	細胞傷害活性 (%)	
	E : T=10 : 1	E : T=30 : 1
None	4.9	25.9
1 u/ml	14.1	61.3
10 u/ml	16.2	55.9
100 u/ml	13.7	50.5

考 察

とが示されている。48時間刺激した OK-MC の培養上清中には、抗腫瘍性サイトカインの1つであるTGIF 活性が出現することをわれわれはすでに報告している¹²⁾。今回、11名の放射線または化学療法を施行中、あるいは施行前の口腔癌患者から得られた OK-MC 培養上清中の TGIF 活性を検索したところ、正常人に検出される活性と同程度（16～64×）の TGIF 活性が検出できた（表4）。

5. IL-2 による OK-MC の細胞傷害活性の増強効果

キラー細胞活性の検出時に IL-2 を種々の濃度で培養中に添加すると E : T=30 : 1で、25.9% の傷害活性が61.3%（IL-2 1 U/ml 添加）へと上昇した。このキラー活性増強効果は必ずしも IL-2 の濃度に依存せず、1 U/ml～100 U/ml の IL-2 濃度で1.9～2.4倍の細胞傷害活性増強効果を認めた（表5）。

近年細胞工学，分子生物学の進歩により，種々のサイトカイン遺伝子がクローニングされている．そのなかでも IL-2¹³⁾は，T 細胞増殖因子としてのみでなく細胞傷害性リンパ球を誘導できることが報告されて以来¹⁾，IL-2 単独で，あるいは *in vitro* で IL-2 刺激により非特異的キラー細胞を誘導しておき，これを再び癌患者に戻す養子免疫療法（AIT）が行われつつある^{14～16)}．しかしながら，一部の特殊な腫瘍症例¹⁷⁾を除いて LAK 細胞の全身投与による AIT 単独療法では，腫瘍の縮小に期待されたほどの効果が得にくいのが現状である．この理由として，全身投与では腫瘍局所への LAK 細胞の集積性が低いこと，腫瘍局所に存在するサプレッサー細胞，あるいはサプレッサーファクターなどによりキラー細胞の効果が抑制される可能性があること，IL-2 の生体内での代謝が非常に速く，半減期が短いため *in vivo* で内在性の抗腫瘍活性をもつ細胞の動員が困難であること，治療時に十分量のリンパ球を得ることは容易ではなく，加えてこれら患者リンパ球は機能的にもすでに低下状態にあることなどが考えられている．

これらの点を改良した方法として，われわれは口腔癌

表 6 TGIF の物理化学的性状

1) 産生細胞	T lymphocyte
2) 分子量	43,000
3) 熱耐性	56°C 30分で安定 70°C 5分で不安定
4) L929細胞の傷害性	なし
5) RBC 溶解能	なし
6) 標的細胞	ヒト悪性腫瘍
7) 作用	cytostatic または cytolytic

の腫瘍局所投与による AIT を成功させるべく、この目的に沿った理想的なエフェクター細胞を求めてきた。

OK-432 は低濃度で効率良くキラー細胞活性を誘導することをわれわれは見出したが、この OK-432 活性化キラー (OKAK) 活性は、 $rIL-2$ で誘導されるキラー活性 (LAK) と異なり 48 時間という短い培養で出現し、NK 感受性 (K562)、NK 非感受性 (Daudi) いずれの標的細胞も同様のキネティックで傷害することがわかった。Uchida ら⁴⁾は、DNA 合成阻害剤を培養中に加えても OK-432 によるキラー細胞誘導活性は消失しないが、RNA 合成阻害剤添加では有効にキラー誘導が抑制されることから、OK-432 のキラー細胞活性誘導には細胞の DNA 合成を必要としないことを示唆している。

OK-432 活性化キラー細胞がいかなる細胞群に属するのかその由来に関しては、いまだ意見の一致をみていない。OK-432 に対する反応細胞は、前述の $M\phi$ 、NK 細胞、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 等々が考えられ、これらのなかでも NK 細胞ならびに LAK 細胞のマーカーである CD57、CD16 を保有する細胞の動向は注目に値する。NK 細胞に属する大型顆粒リンパ球 (large granular lymphocyte) が OK-432 で誘導されるキラー活性を担っているとする Uchida らの報告⁴⁾も、詳しい細胞表面抗原の検索はなされておらず、これらが成熟 NK 細胞に属するのか、NK 前駆細胞に属しているのかは不明である。しかし、本研究で示したように OK-432 刺激 48 時間後には、CD57 ならびに CD16 陽性細胞率が増加し、Tac ($IL-2$ レセプター) 陽性細胞も高率に出現することから NK 細胞の活性化が起こることは疑いないようである。一方、 $IL-2$ 活性化キラー (LAK) 細胞の表面抗原については Rosenberg らが、モノクローナル抗体と補体を用いた方法で検索し、OKM 1⁺、Leu 1⁺、OKT 3⁺、OKT 8⁺、Leu 7⁺ の T 細胞であると報告している¹⁾。また Leu 11 (CD16) 陽性の NK 細胞が LAK 活性を担っているとする報告もある^{18,19)}。いずれにせよ、OK-432 で誘導されるキラー細胞活性は、短期間の培養で出現し、これが比較的長期間 (5 日間以上) の培養で最大値に達する LAK 活性と根本的に異なることは明白である。さらに OKAK の標的細胞特異性を検索す

るため、cold target inhibition assay を行くと、NK 細胞の標的細胞である K562 細胞の傷害活性が、LAK 細胞の標的細胞である PC3 を cold target にすることで高率に抑制された (未発表)。このことは、誘導されるキラー細胞群が K562 や PC3 を傷害する NK または LAK 様の標的細胞特異性をもつ複数の細胞集団からなること、あるいは Herberman ら²⁰⁾が報告しているように NK 細胞、LAK 細胞が同一の標的細胞抗原を認識している可能性を示唆している。また自己 (Autologous) または同種異型 (Allogeneic) いずれの PBMC から誘導された OKAK も、同一の新鮮腫瘍細胞を傷害しており (表 3)、これらが HLA 拘束性を示さない非特異的なキラーであることが示された。

一方、OK-432 で誘導されるもう 1 つの抗腫瘍活性として、培養早期からヒト癌細胞の増殖を抑制するサイトカイン (TGIF) が産生されることをわれわれは報告している^{12,21)}。周知のように、OK-432 は $IL-1$ 、 $IL-2$ ²²⁾、 $IFN\gamma$ ⁹⁾、 TNF ¹⁰⁾、 $NKAF$ ¹¹⁾、 $IL-6$ ²³⁾などの種々のサイトカイン産生を誘導する BRM として脚光を浴びている。しかし、表 6 に示すように、TGIF は、T 細胞が産生する分子量 43,000 の蛋白質で、その活性は比較的熱耐性であること、L929 細胞に対する細胞傷害性を有しないこと、RBC 溶解能を有しないことなどの物理化学的特性を有している¹²⁾。さらに既存のサイトカインに対するモノクローナル抗体を用いた中和試験の結果、 $IFN\gamma$ 、 TNF 、 LT などとは異なる物質であることがわかった^{7,12)}。一方、この TGIF 活性は $IL-2$ 活性化 PBMC の培養上清中には、ほとんど検出できない⁷⁾。これらの事実は、キラー細胞による直接細胞傷害活性と細胞傷害性サイトカインの両者が、OK-432 活性化 PBMC のエフェクター活性として期待できることを示している。事実、癌患者の OK-432 活性化 PBMC 培養上清中には正常者の PBMC を刺激した時と同程度の、16~64 倍の TGIF 活性が検出された (表 4)。

これらの特性を有する OK-MC を、われわれはすでに局所養子免疫療法のエフェクター細胞として臨床応用を始めている。前述のように、全身投与方法による AIT を成功させるための絶対的条件は腫瘍局所へ効率よく LAK 細胞を集積させることで、このために LAK 細胞の大量培養法が種々考案されている。特に、Ochoa ら²⁴⁾は抗 CD3 抗体と $IL-2$ により LAK 活性をもつ細胞の長期培養法を報告し、田口ら²⁵⁾は培養装置の改良により高率に細胞増殖を起こさせ大量の細胞を得る方法を紹介している。しかしながら、長期間の培養により培養中への細菌、ウイルスなどの汚染や患者への多量のサイトカイン投与による副作用も危惧されている。

OK-MC は、短期間の培養で効率よく抗腫瘍活性が誘導でき、培地中への汚染も最小限に減らすことができる利点がある。さらに、48 時間培養した OK-MC の細

胞傷害活性が IL-2 添加により約 2 倍に増強されることを今回見出した。この IL-2 によるキラー活性増強効果は 10 日ないし 12 日間培養しておいた OK-MC にも認められ (未発表), OK-432 刺激により, キラー細胞活性をもつ細胞が長期にわたり培養中に維持できることがわかった。通常, 無血清培地中で PBMC を OK-432 で刺激してもほとんど細胞増殖反応は検出できず, 細胞回収率の低いことが OK-MC の欠点でもあった。しかしながら, 上記の事実は, サイトカイン (IL-2) との組合せにより, OK-MC の細胞傷害活性を効果的に調節できる新しい AIT の手法を開発する糸口になるものと思われる。

口癌は直視可能な皮膚や粘膜面に発生することが多く, 顔面のこれらの領域は, 浅側頭動脈あるいは上甲状腺動脈からのカニューレーションにより動注法による化学療法が容易に行える部位であり, 腫瘍局所投与による AIT の効果が最も期待できるものと思われる。したがって, 安価で, 簡単に, しかも効果的な抗腫瘍活性 (細胞性ならびに液性) が得られる OK-MC を使った AIT は, 頭頸部癌の治療に有効であると考ええる。

結 語

OK-432 で活性化した PBMC を用いた AIT を施行するための基礎的実験として, OK-432 刺激により PBMC 中に誘導される抗腫瘍活性の特性を究明し以下の結果を得た。

1. 低濃度の OK-432 刺激により 48 時間でプラトーに達する細胞傷害活性 (OKAK) が誘導された。
2. OK-432 刺激で PBMC 中に CD57⁺/CD25⁺, CD16⁺/CD25⁺ の表面マーカーをもつ細胞の増加が認められた。
3. OKAK は新鮮腫瘍細胞も傷害し, その標的細胞傷害特性は非特異的と考えられた。
4. 担癌患者の PBMC からも OK-432 刺激により抗腫瘍性サイトカインである TGIF 活性が検出された。
5. OKAK 活性はキラー細胞活性測定時に IL-2 を添加すると, その細胞傷害活性が増強されることがわかった。

なお, 本論文要旨の一部は, 第 34 回日本口腔外科学会総会 (1989, 郡山), 第 8 回日本口腔腫瘍学会総会 (1990, 浦和), 第 28 回日本癌治療学会総会 (1990, 東京) において口演発表した。

本研究の一部は, 平成 3 年度文部省科学研究費一般研究 (C) (課題番号—03670949) により行った。

引 用 文 献

- 1) Grimm, E.A., Mazumder, H.Z., et al.: Lym-

phokine 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: 1823-1840 1982.

- 2) Talmage, J.E. and Herbermann, R.B.: The preclinical screening laboratory: Evaluation of immunomodulatory and therapeutic properties of biological response modifiers. *Cancer Treatment Reports* 70: 171-182 1986.
- 3) Saito, M., Nanjo, M., et al.: Activated macrophages are responsible for the tumor inhibitory effect in mice receiving intravenous injection of OK-432. *Int J Cancer* 33: 271-276 1984.
- 4) Uchida, A. and Mickshe, M.: Lysis of fresh tumor cells by autologous peripheral blood and pleural effusion lymphocytes activated by OK-432. *J Natl Cancer Inst* 71: 673-680 1983.
- 5) Saito, M., Nanjo, M., et al.: Adoptive immunotherapy by pantropic killer cells recovered from OK-432-injected tumor sites in mice. *Cancer Res* 48: 4163-4167 1988.
- 6) Hojo, H. and Hashimoto, Y.: Cytotoxic cells induced in tumor-bearing rats by a streptococcal preparation (OK-432). *Gann* 72: 692-699 1981.
- 7) 久保田英朗, 片野光男, 他: ヒト由来 A 群溶連菌製剤 (OK-432) 刺激によるヒト末梢血単核球からの腫瘍細胞傷害活性の誘導の検討. *BIO-THERAPY* 4: 1549-1554 1990.
- 8) Kubota, E., Ishikawa, H., et al.: Modulation of F₁ cytotoxic potentials by GVHR host- and donor-derived cytotoxic lymphocytes arise in the unirradiated F₁ host spleens under the condition of GVHR-associated immunosuppression. *J Immunol* 131: 1142-1148 1983.
- 9) De Ley, M. and Claeys, H.: Streptococcal preparation OK-432-induced interferon in human leukocytes: purification and characterization. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 74: 21-28 1984.
- 10) Yamamoto, A., Nagamuta, M., et al.: Release of tumor necrosis factor (TNF) into mouse peritoneal fluid by OK-432, a streptococcal preparation. *Immunopharmacology* 11: 79-86 1986.
- 11) Ichimura, O., Suzuki, S., et al.: Characterization of mouse natural killer cell activation factor (NKAF) induced by OK-432: Evidence for interferon- and interleukin 2-independent NK cell activation. *Br J Cancer* 50: 97-108 1984.
- 12) Katano, M., Yamamoto, H., et al.: Induc-

- tion of tumor growth inhibitory factor (TGIF) in human mononuclear cells by OK-432, a streptococcal preparation. *Cancer Immunol Immunother* 27: 198-204 1988.
- 13) Taniguchi, T., Matsui, H., et al.: Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2 *Nature* 302: 305-309 1983.
 - 14) Pick, E. and Landy, M.: *Lymphokine*, vol 19, Academic Press, New York, 1983, p 279-309.
 - 15) Rosenberg, S.A.: Adoptive immunotherapy of cancer: Accomplishments and prospects. *Cancer Treat Rep* 68: 233-255 1984.
 - 16) Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., et al.: 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 1987.
 - 17) Slankard-Chahinian, M., Holland, J.F., et al.: Adoptive autoimmunotherapy: cytotoxic effect of an autologous long-term T-cell line on malignant melanoma. *Cancer* 53: 1066-1072 1984.
 - 18) Itoh, K., Tilden, A.B., et al.: 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.
 - 19) Seki, H., Ueno, Y., et al.: Mode of *in vitro* augmentation of natural killer cell activity by recombinant human interleukin-2: A comparative study of Leu 11⁺ and Leu 11⁻ cell populations in cord blood and adult peripheral blood. *J Immunol* 136: 2351-2356 1985.
 - 20) Herberman, R.B., Hiserodt, J., et al.: Lymphokine-activated killer cell activity characteristics of effector cells and their progenitors in blood and spleen. *Immunol Today* 8:178-181 1987.
 - 21) Katano, M., Kubota, E., et al.: A possible clinical application of multicytokine-producing cytotoxic mononuclear cell (MCCM) therapy. *Biotherapy* 3: 373-379 1991.
 - 22) Ichimura, O., Suzuki, S., et al.: Augmentation of interleukin-1 and interleukin-2 production by OK-432. *Int J Immunopharmacol* 7: 263-270 1985.
 - 23) Fukui, H., Koshihara, Y., et al.: Production of interleukin-6 by human spleen cells stimulated with streptococcal preparation OK-432. *Immunol Letters* 21: 127-130 1989.
 - 24) Ochoa, A.C., Gromo, G., et al.: Long term growth of lymphokine-activated killer (LAK) cells; role of anti-CD3, β IL-1, interferon- α and - β . *J Immunol* 138: 2728-2733 1987.
 - 25) 田口鐵男, 田中利茂, 他: アキュシストテクノロジーを使用した高密度細胞培養システム[5]. *BIO THERAPY* 4: 1582-1585 1990.