口腔悪性腫瘍組織浸潤リンパ球からの抗腫瘍活性の誘導に関する研究

森 良之

Studies on induction of antitumor cytotoxicity on tumor infiltrating lymphocytes of patients with oral malignant tumors

Yoshiyuki MORI

Abstract: Previous reports indicated that the histological intensity of the tumor infiltrating lymphocytes (TIL), which is one of the manifestations of immunological host's response against malignant tumor cells, correlates with the clinical prognosis of the cancer patients.

In the present study, we investigated the antitumor cytotoxicity of TIL (or LN-TIL: lymphocytes of metastatic lymph node) induced by anti-CD3 antibody and interleukin 2 (IL-2), and the availability for the source of the adoptive immunotherapy on patients with oral malignant tumors.

TIL were isolated from 28 tumors and LN-TIL were isolated from 6 metastatic lymph nodes obtained from 28 patients with oral malignant tumors.

Natural killer (NK) and lymphokine-activated killer (LAK) activity of freshly isolated TIL were usually undetectable. However the antitumor cytotoxicity of TIL was generated with IL-2 *in vitro* culture. These activated TIL showed high levels of NK and LAK activities, and these were prolonged more than those of PBL.

On the other hand, freshly isolated TIL from patients who received IL-2 injection directly into the tumor lesions before surgery, showed NK and LAK activities.

The growth of TIL were obviously enhanced by using the plates coated with anti-CD3 antibody at the beginning of the culture.

These activated TIL (or LN-TIL) with anti-CD3 antibody and/or IL-2 also showed the cytotoxicity against the autologous tumor cells.

These results indicate that anti-CD3 antibody and IL-2 augment the specific and/or non-specific cytotoxicity of the TIL (or LN-TIL) against the tumor cells, and this augmentation of cytotoxic activity shows the anti-tumoral efficacy for oral malignant tumors. Furthermore, TIL (or LN-TIL) from oral malignant tumors could be on appropriate effector cells for adoptive immunotherapy on the patients with oral malignant tumors.

Key words: oral malignant tumor (口腔悪性腫瘍), tumor infiltrating lymphocytes (TIL) (腫瘍組織浸潤リンパ球), interleukin 2 (IL-2) (インターロイキン 2), anti-CD3 antibody (抗 CD3 抗体), antitumor cytotoxicity (抗腫瘍活性)

緒 言

ヒト悪性腫瘍組織には単核細胞浸潤があり、その浸潤の程度と患者の予後とが密接に関連していることが悪性黒色腫例¹⁾で報告されている。また、胃癌²⁾の症例では原発癌組織間質にリンパ球浸潤が強いほど予後良好で、5年生存率と相関することが報告されている。これらの理由から悪性腫瘍に浸潤するリンパ球は、古くから腫瘍免疫反応の表現の1つとして興味をもたれてきた。

口腔癌においても原発癌組織間質にリンパ球浸潤が強いほど、予後良好で5年生存率と相関する傾向が認められている³⁾。また、Hiratuka ら^{4,5)}は口腔癌病巣内にはT細胞浸潤が多いことを報告している。すなわち、原発腫瘍が小さい症例、また頸部リンパ節転移のない症例でT細胞浸潤が強く認められること、またプレオマイシンによる腫瘍縮小率と生検時のT細胞浸潤の強さとが相関するという口腔癌組織におけるT細胞浸潤の臨床的重要性を述べている。

このように腫瘍組織に対する宿主の免疫学的防御反応があるとすれば、それは腫瘍の増殖局所において最も端的にあらわれると考えられる。

そこで、口腔悪性腫瘍組織においても、リンパ系細胞が腫瘍の増殖を抑える上で重要な役割を果たしているという観点に立てば、局所に浸潤する単核細胞浸潤(腫瘍組織浸潤リンパ球:Tumor infiltrating lymphocytes (TIL))の機能を解析することはきわめて重要であると考えられる。さらに腫瘍細胞が転移している所属リンパ節組織のリンパ球(転移リンパ節リンパ球:以下LN-TIL)においても同様の重要性が考えられる。

一方、1976年にMorgan⁶⁾らによりT cell growth factor (TCGF)が発見され、のちにInterleukin-2(IL-2)と命名されて以来、遺伝子工学技術の進歩により遺伝子組換えIL-2(recombinant IL-2, rIL-2)が大量に供給可能となった⁷⁾。

このIL-2で癌患者の末梢血リンパ球(peripheral blood lymphocytes: PBL)を刺激すると、自己固形腫瘍を含む各種の癌細胞に対して強い細胞障害活性を示すlymphokine-activated killer (LAK)細胞が誘導されることがRosenberg らのグループにより報告され⁸⁾、今までにIL-2の単独投与あるいは*in vitro*で大量に誘導したLAK細胞を用いた養子免疫療法⁹⁻¹¹⁾が盛んに行われている。

またRosenberg らは担癌マウスに対するTIL 移入はLAK 養子免疫療法の50~100倍 *in vivo* 治療効果があることを報告し¹²⁾、それにつづいて転移性メラノーマに対する臨床治験を行いTIL 移入による高い治療効果を報告している¹³⁾。このように養子免疫療法の効果を一層増強させるための移入細胞として、腫瘍組織に対する宿主

の免疫学的防御反応と考えられるTILを用いる研究も盛んに行われるようになってきている。

また、この養子免疫療法に用いる移入細胞の細胞障害活性ならびに細胞増殖能を増強するために、Tリンパ球の表面マーカーに対する抗体であり、*in vitro*でTリンパ球にマイトジェニックに作用する抗CD3抗体を用いて、Tリンパ球を効率よく増殖させる方法も試みられて¹⁴⁻¹⁹⁾いる。

そこで今回、口腔悪性腫瘍におけるTILおよびLN-TILの機能を解析する1つの側面として、抗腫瘍活性の誘導について検索を行い、さらに口腔悪性腫瘍に対する養子免疫療法に用いる移入細胞の有用性をあきらかにすることを目的として以下の検討を行った。

すなわち、口腔悪性腫瘍患者からTILを分離し、IL-2による*in vitro*での細胞障害活性および細胞増殖能の増強を試み、抗腫瘍活性誘導の可能性について検討した。また、術前治療として腫瘍組織周囲にIL-2の局所投与を行い、切除標本より分離された新鮮TILの細胞障害活性(NKおよびLAK活性)を測定し、IL-2の腫瘍局所投与によるTILの抗腫瘍免疫能誘導の可能性について検討した。さらに、T細胞を選択的に増殖させることを目的として、抗CD3抗体およびIL-2を用いてTILおよびLN-TILについて同様の検索を行い、養子免疫療法の移入細胞としての有用性について検討した。

研究 方 法

1. 研究対象

研究対象は、1987年5月より1990年8月までの3年4か月間に東京医科歯科大学歯学部第2口腔外科で腫瘍切除手術が行われた、口腔悪性腫瘍患者のうちから任意に選択した28名である。検索組織は、腫瘍原発組織28検体、腫瘍転移のある所属頸部リンパ節6検体であった。検索した腫瘍原発組織の内訳は、部位別では上顎10例、舌8例、下顎5例、頬粘膜2例、口底、顎下腺、口峽咽頭部がそれぞれ1例ずつであり、組織型別では、扁平上皮癌22例、悪性黒色腫2例、横紋筋肉腫、骨肉腫、粘表皮癌、腺様嚢胞癌がそれぞれ1例ずつであった。腫瘍転移リンパ節の組織型は、扁平上皮癌5例、悪性黒色腫1例であった。切除された腫瘍原発組織の病理組織標本による腫瘍局所のリンパ球浸潤度はBlack ら²⁰⁾のLIGradeに従った。また癌の臨床的進行度は1987年UICC提案のStage分類に従った(表1, 2)。比較対象の末梢血リンパ球は検体の得られた同一個人より採取した。

2. IL-2の局所投与

症例13~20までの8例に対して、原則として 0.7×10^6 JRU のレコンビナントIL-2(rIL-2: S6820, 塩野義製薬)を1%キシロカイン®に溶解後、腫瘍周囲組織に

表 1 口腔悪性腫瘍組織より分離され IL-2 単独で培養された腫瘍組織浸潤リンパ球 (TIL)

症 例	診断(TNM stage)	術前治療	LI grade	回収細胞数	L/T 比	最大獲得細胞数 (日)	培養可能日数
1.	56M	顎下腺 Mucoepid. Ca. (T3aN2bM1 IV)	MTX: 225mg 5FU: 1, 500mg i.v.*	ND ¹⁾	0.86×10 ⁶	ND ²⁾	5.15×10 ⁷ (21) 21(凍結保存)
2.	57M	下顎歯肉 SCC (T4N0M0 IV)	施行せず	3	0.21×10 ⁶	ND	1.15×10 ⁸ (56) 83(細菌汚染)
3.	62F	下顎歯肉 SCC (T3N1M0 III)	MTX: 150mg 5FU: 2, 000mg i.v.	3	3.30×10 ⁶	ND	6.60×10 ⁷ (21) 34(細菌汚染)
4.	44F	上顎洞 SCC (T4N0M0 IV)	Linac 4MV Xray 25Gy	2	3.40×10 ⁶	ND	4.42×10 ⁷ (28) 35(測定)
5.	69F	上顎洞 Osteosarcoma	施行せず	2	8.50×10 ⁶	1.9	3.31×10 ⁷ (27) 33(測定)
6.	51M	舌 SCC (T4N2aM0 IV)	Linac 4MV Xray 30Gy	1	0.31×10 ⁶ (1.6 g)	3.2	増殖せず —
7.	65F	上顎歯肉 SCC (T2N0M0 II)	施行せず	1	0.13×10 ⁶ (0.2 g)	ND	増殖せず —
8.	31M	舌 SCC (rTxN2aM0 IV)	施行せず	2	1.03×10 ⁶ (0.7 g)	2.7	2.32×10 ⁷ (23) 23(凍結保存)
9.	60M	舌 SCC (T2N1M0 III)	施行せず	ND	5.70×10 ⁶ (0.85 g)	5.3	8.43×10 ⁷ (16) 35(測定)
10.	74M	下顎歯肉 SCC (T3N0M0 III)	MTX: 750mg 5FU: 500mg i.v.	ND	0.56×10 ⁶ (0.5 g)	1.0	2.18×10 ⁸ (9) 14(細菌汚染)
11.	68M	下顎歯肉 SCC (T2N0M0 II)	施行せず	2	1.60×10 ⁶ (0.25 g)	1.9	すべて測定に使用(培養せず)
12.	18M	上顎洞 Rhabdomyosarcoma	施行せず	1	4.00×10 ⁶ (0.8 g)	1.0	3.56×10 ⁸ (37) 51(測定)
13.	72F	舌 SCC (T3N1M0 III)	IL-2 局注 8.4×10 ⁶ JRU	3	8.33×10 ⁶	ND	すべて測定に使用 7(測定)
14.	64M	頬粘膜 SCC (T4N1M0 IV)	IL-2 局注 15.4×10 ⁶ JRU	3	9.60×10 ⁶	ND	すべて測定に使用(培養せず)
15.	45M	舌 SCC (rT2N0M0 II)	IL-2 局注 14×10 ⁶ JRU	3	1.80×10 ⁶	ND	1.08×10 ⁸ (25) 25(測定)
16.	59M	舌 SCC (T1N1M0 III)	IL-2 局注 12.6×10 ⁶ JRU	3	4.90×10 ⁶	ND	1.91×10 ⁷ (13) 13(測定)
17.	63F	口峽咽頭 SCC (T2N1M0 III)	IL-2 局注 14.7×10 ⁶ JRU	ND	1.60×10 ⁶	ND	2.49×10 ⁷ (13) 39(細菌死滅)
18.	58M	口蓋 SCC (T2N0M0 II)	IL-2 局注 8.4×10 ⁶ JRU	3	0.13×10 ⁶	6.0	増殖せず —
19.	64M	舌 SCC (rT2N0M0 II)	IL-2 局注 13.3×10 ⁶ JRU	3	0.60×10 ⁶	3.4	すべて測定に使用(培養せず)
20.	70F	頬粘膜 SCC (rT2N0M0 II)	IL-2 局注 29.4×10 ⁶ JRU	3	0.63×10 ⁶ (0.6 g)	3.2	2.33×10 ⁸ (11) 28(測定)

培養可能日数でのカッコ内は、培養中止理由を示す。
*: 経静脈的投与, ND¹⁾: LI-grade の確認されていない検体, ND²⁾: 腫瘍細胞が不明瞭で L/T 比が算出不能な検体.

連日注射した。投与期間は12〜22日であった (表 1)。
3. リンパ球の分離²¹⁾
1) 末梢血リンパ球 (PBL) の分離
腫瘍切除術施行日の早朝にヘパリン加採血した被検者の末梢静脈血を、リン酸緩衝液 (PLS: 日水製薬) で 2

〜3 倍に希釈し、リンパ球分離溶液 (リンホセパール: IBL 社製, 比重1.077) を用いて比重遠心法 (900G, 10 分間) で分離した。生じた分離界面上の細胞層を採取し、非働化牛胎児血清 (HI, FCS) 2.5% を含む PBS で 3 回洗浄後、下記の Complete Medium (CM) 中に

表 2 口腔悪性腫瘍組織より分離され抗 CD3 抗体および IL-2 で培養された腫瘍組織浸潤リンパ球 (TIL および LN-TIL)

症 例	診 断 (TNM stage)	術前治療	LI grade	回収細胞数	L/T 比	最大獲得細胞数 (日)	培養可能日数
21. 63M	下顎歯肉 SCC (T4N0M0 IV)	Linac 4MV Xray 27.5Gy OK432 : 33.2KE	2	TIL: 0.26×10^6 (0.65 g) LN-TIL: 2.56×10^6 (0.4 g)	0.9 14.6	1.43×10^9 (28) 6.91×10^9 (28)	28(凍結保存) 28(凍結保存)
22. 63M	口蓋 Malignant Melanoma	施行せず	3	TIL: 0.44×10^6 (0.15 g)	0.7	2.80×10^9 (30)	37 (測定)
23. 60M	舌 SCC (T4N2aM0 IV)	Tele ⁶⁰ Co 30Gy	3	TIL: 3.30×10^6 (0.5 g) LN-TIL: 3.21×10^6 (0.3 g)	1.4 ND ²⁾	1.00×10^9 (28) 7.22×10^8 (28)	40 (測定) 35 (測定)
24. 67M	口底 SCC (T4N0M0 IV)	施行せず	ND ¹⁾	TIL: 0.46×10^6 (0.3 g)	7.6	増殖せず	14 (測定)
25. 46M	上顎歯肉 SCC (T4N1M0 IV)	Linac 4MV Xray 42.5Gy 5FU: 2,000mg LAK 療法 i.a.*	1	TIL: 1.94×10^6 (1.0 g) LN-TIL: 44.25×10^6 (1.8 g)	0.5 16.9	9.70×10^7 (9) 7.96×10^8 (18)	10(細菌汚染) 18(細胞移入)
26. 69F	口蓋 Adenoid Cystic Ca (T4N0M0 IV)	LAK 療法 i.a.	1	TIL: 0.23×10^6 (0.2 g)	ND	6.87×10^7 (19)	19(細胞移入)
27. 67M	上顎洞 SCC (T4N2bM0 IV)	Linac 4MV Xray 25Gy LAK 療法 i.a.	1	TIL: 0.41×10^6 (0.5 g) LN-TIL: 6.72×10^6 (0.4 g) LN-TIL**: 16.1×10^6 (1.7 g)	4.8 12.6 15.5	増殖せず 6.29×10^8 (17) 8.98×10^8 (18)	(細菌汚染) 17(細胞移入) 18(細胞移入)
28. 81M	口蓋 Malignant Melanoma	OK432 : 15KE	2	TIL: 0.67×10^6 (0.1 g) LN-TIL: 7.5×10^6 (1.1 g)	ND 3.8	6.90×10^8 (14) 3.13×10^8 (14)	14(凍結保存) 14(凍結保存)

培養可能日数でのカッコ内は、培養中止理由を示す。
*: 経動脈的投与, **: 2 回目の手術で得られた検体, ND¹⁾: LI-grade の確認されていない検体, ND²⁾: 腫瘍細胞が不明瞭で L/T 比が算出不能な検体。

浮遊させ、Türk 液染色によりリンパ球数を算出したものを PBL とした。

培養液として、10% ヒト AB⁺ 血清、100 U/ml ペニシリン G カリウム (明治)、100 μg/ml 硫酸ストレプトマイシン (明治) を含む RPMI 1640 培地 (日水製薬) および 5% ヒト AB⁺ 血漿を含む HyMedium 910 (コージンバイオ社) を CM とした。ヒト血清および新鮮凍結血漿から融解された血漿は、56°C で 30 分間非働化して使用した。

2) 腫瘍組織浸潤リンパ球 (TIL) および腫瘍転移リンパ節リンパ球 (LN-TIL) の分離

TIL は、手術切除標本の腫瘍組織塊をはさみで細切後、酵素処理 (collagenase Type V-S (SIGMA) 2mg/

ml, DNase-I Type II (SIGMA) 0.002%, Hyaluronidase Type VI-S (SIGMA) 100 u/ml を含む培養液中で、37°C で 90 分から 3 時間旋回培養器中で振とう) を行い組織を融解し、ナイロンメッシュ (200 mesh) を通過させ、PBL の分離と同様に比重遠心法で分離し培養液中に浮遊させた。

LN-TIL は、手術切除標本より肉眼的に腫瘍転移の認められたリンパ節を採取し、少量の培養液を加えハサミで細切後ナイロンメッシュ (200 mesh) を通過させ、PBL と同様の方法で分離した。

培養液中に浮遊された細胞は、トリパンブルーによる dye exclusion test で、リンパ球の生細胞数およびリンパ球腫瘍細胞比が算出された。

4. 新鮮腫瘍細胞の分離・保存

TIL, LN-TIL の分離時に同一の腫瘍組織塊より新鮮腫瘍細胞を分離した。分離法は上記の TIL と同様の方法で行い、最終的に比重遠心をせずに洗浄し、培養液に浮遊させた。凍結用培養液 (90% HI. AB⁺ Human Serum, 10% Dymethyl sulfoxide (DMSO): SIGMA) に浮遊させ、液体窒素中で凍結保存し、測定時に融解し、自己新鮮腫瘍細胞として標的細胞に用いた。

5. リンパ球の培養、保存

リンパ球を $5 \sim 6.25 \times 10^6$ 個/ml に調整し、 $140 \sim 350$ JRU/ml の IL-2 を含む CM 中で 5% CO₂, 37°C 条件下で培養し、IL-2 活性化細胞を誘導した。

また、培養初期に 10 μ g/ml の抗 CD3 抗体 (人体投与用 OKT3 製剤: ヤンセン協和) で固相化したプレートを用い、700 JRU/ml の IL-2 を含む CM 中で培養し抗 CD3 抗体/IL-2 活性化細胞を誘導した。

リンパ球の培養開始は、96 穴平底プレート (NUNCLON) を用いた。培養されたリンパ球の一部は、凍結用培養液 (90% HI. AB⁺ Human Serum, 10% DMSO) に浮遊させ、液体窒素中で凍結保存した。必要に応じて細胞融解後 700 JRU/ml の IL-2 を含む 10% AB⁺ HS. RPMI 1640 培地で 4 日間培養後測定に供した。

6. 細胞増殖能の測定

培養期間中、経時的に培養リンパ球の一部を採取し、トリパンブルーによる dye exclusion test およびリンパ球数の算出を行った。培養リンパ球の増殖曲線を描記し、それぞれの細胞の最大増殖率および細胞数が最大に達するまでの日数および最大獲得細胞数を算出した。また、TIL の IL-2 に対する細胞増殖反応を ³H-thymidine (TdR) の取り込み量によって測定した。すなわち、96 ウェル平底プレート (Falcon 3042) を使用し、細胞を 2×10^4 個/200 μ l/ウェルに分注し、0, 7, 70, 700 JRU/ml の各濃度の IL-2 で 3 日間培養し、収穫 18 時間前に ³H-TdR (New England Nuclear, Specific Activity 5.0 Ci/mmol に調整) を 0.5 μ Ci ずつ各ウェルに滴下し、培養終了後セルハーベスター (Titertek) で収穫し細胞内に取り込まれた ³H-TdR を液体シンチレーションカウンタ (パッカード 460 C) で測定した。

7. 樹立細胞株の培養

K 562 (慢性骨髄性白血病由来細胞株) および Daudi (バーキットリンパ腫由来細胞株) 細胞は、10% HI. FCS 加 RPMI 1640 培地で培養維持された。NA (舌扁平上皮癌由来細胞株), OM-1 (舌扁平上皮癌由来細胞株: 症例 8) および RS-1 (上顎洞横紋筋肉腫由来細胞株: 症例 12) 細胞は、10% HI. FCS 加 DMEM 培地 (SIGMA) で培養維持された。

8. 細胞障害活性の測定

細胞障害活性の測定は、4 時間の ⁵¹Cr 遊離試験法で行った。NK 活性の測定には NK 感受性細胞株である K

562 を、LAK 活性の測定には NK 非感受性細胞株である Daudi および NA を標的 (Target) 細胞として用いた。さらに自己腫瘍細胞に対する細胞障害活性を測定するために、培養腫瘍細胞株として OM-1, RS-1 を、新鮮腫瘍細胞として上顎洞横紋筋肉腫 (症例 12) および口蓋悪性黒色腫 (症例 28) を標的細胞として用いた。

標的細胞は ⁵¹Cr (Na₂⁵¹CrO₄, New England Nuclear) 3,700 KBq を添加し、37°C で 1 時間標識した後、3 回洗浄し 5×10^3 個/0.1 ml/well となるように調整した。単層培養細胞である NA, OM-1 および RS-1 については、0.1 mM EDTA (同仁化学), 1,000 U/ml トリプシン (持田製薬) を含む PBS で処理後、単細胞浮遊液として標識した。エフェクター (Effector) 細胞を種々の effector/target (E/T) 比となるように調整し 100 μ l ずつ 96 穴 U 底プレート (住友マルチプレート) に撒き、その後標的細胞を加え全量 10% HI. FCS 加 RPMI 1640 培地 200 μ l/well とし、プレートを 200 G, 60 秒間遠心後、5% CO₂, 37°C で 4 時間反応させた。

反応終了後、培養上清を 100 μ l ずつ採取し、上清中に放出された ⁵¹Cr の放射活性をガンマシンチレーションカウンタ (パッカード 800 C) にて測定した。

細胞障害活性 (% lysis) は次式で計算した。

$$\text{細胞障害活性 (\% lysis)} = \frac{\text{実験遊離 (experimental release)} - \text{自然遊離 (spontaneous release)}}{\text{最大遊離 (maximum release)} - \text{自然遊離 (spontaneous release)}} \times 100$$

最大遊離は標的細胞を 20% triton X (Sigma) を含む PBS で溶解したもの、自然遊離は標的細胞のみを培養したものの計測値である。

Lytic unit (LU)²²⁾ は、 5×10^3 個の標的細胞の 33.3% を障害するエフェクター細胞数を 1 LU と表し、LU/1 $\times 10^6$ を計算で求めて表示した。

研究結果

1. 腫瘍組織浸潤リンパ球 (TIL) および腫瘍転移リンパ節リンパ球 (LN-TIL) の分離結果 (表 1, 2)

検索症例 28 例 (34 検体) のうち、TIL, LN-TIL が増殖したものは、分離直後に TIL としてすべて細胞障害活性の測定に用いたもの 4 検体 (症例 11, 13, 14, 19: TIL) を除いて 25 検体で、全体の 83% (25/30 検体) であった。増殖しなかったものの内訳は、分離後に細菌汚染を起こし増殖率の測定できなかったものが 1 検体 (症例 27: TIL), 分離後増殖しなかったものが 4 検体 (症例 6, 7, 18, 24 すべて TIL) であった。

まず TIL の回収率 (腫瘍組織 1 g 当りのリンパ球数) を算出し、原発腫瘍の組織型、術前治療の有無および LI grade との関係を検討した (図 1)。その結果、原発腫瘍組織型の検討では扁平上皮癌の TIL の回収率は横

図1 原発腫瘍組織型、術前治療の有無および LI grade と TIL の回収細胞数との関係。

図2 TIL および LN-TIL の回収細胞数ならびにリンパ球/腫瘍細胞比 (L/T 比)。

紋筋肉腫、悪性黒色腫に比べて低い傾向であった。術前治療の有無では、術前治療の施行されていない群で回収率は高い傾向であった。さらに術前治療として施行された放射線療法、化学療法、LAK 細胞による養子免疫療法、IL-2の腫瘍局所投与および OK432 の皮内投与などの免疫療法、放射線 + 免疫療法の間で、回収細胞数との関連性は認められなかった。原発腫瘍の LI grade では、grade の高いほど TIL の回収率が高くなる傾向であった。

さらに回収細胞中の腫瘍細胞の混入率を比較する意味で、TIL と LN-TIL の回収率およびリンパ球/腫瘍細胞比 (L/T 比) を算出し比較した (図2)。その結果、回収率の比較では、TIL では 0.19×10^6 個/g $\sim 6.70 \times 10^6$ 個/g で平均 $2.79 \pm 2.54 \times 10^6$ 個/g、LN-TIL では 6.40×10^6 個/g $\sim 24.58 \times 10^6$ 個/g で、平均 $12.46 \pm 7.02 \times 10^6$ 個/g であった。L/T 比の比較では、TIL では $0.5 \sim 7.6$ で平均 2.84 ± 2.12 、LN-TIL では $3.8 \sim 16.9$ で平均 12.68 ± 5.20 であった。回収率、L/T 比ともに TIL と LN-TIL との間に有意差が認められた。

2. IL-2 で培養中の TIL の細胞増殖能と細胞障害活性

1) 細胞数の推移と培養日数

IL-2 単独培養による TIL の細胞増殖能を観察した (図3)。その結果、最大増殖率は、TIL が PBL よりも高く、PBL では $1.4 \sim 84.3$ 倍で平均 22.6 ± 23.9 倍であったのに対し、TIL では $3.7 \sim 890$ 倍で平均 127.8 ± 272.5 倍であった。ここでは有意差はみられなかったが、PBL と比較して TIL の優れた増殖能が観察された。細胞数が最大に達するまでの培養日数は、TIL では $9 \sim 56$ 日で平均 23.1 ± 12.7 日で、PBL は $8 \sim 39$ 日で平均 22.3 ± 10.1 日であり、両者ともほぼ同様であった。TIL の最大増殖率が PBL を上回った症例は、6 例 (症例 1, 2, 9, 10, 12, 15) で同一個人で比較できた12例のうちの50%であった。TIL の最大獲得細胞数は、 $2.18 \times 10^6 \sim 3.56 \times 10^9$ の範囲で、平均 3.17×10^7 個であった (表1)。

さらに、TIL の IL-2 に対する反応性を PBL と比較検討するため、最も高い増殖率を示した症例12について、増殖反応を異なった濃度の IL-2 で培養し経時的に測定した (表3)。

図 3 IL-2 活性化 TIL および PBL (LAK) の細胞増殖能。
図中の数字は症例番号を示す。

表 3 TIL の IL-2 に対する増殖反応

IL-2 濃度 培養日数		³ H-TdR 取り込み量 (CPM)			
		0	7	70	700 (JRU/ml)
13日目	TIL	1,009.0±98.7	24,041.2±2,306.9	NT	29,438.3±778.8
	PBL	538.9±52.2	24,515.8±409.7	NT	26,700.7±591.8
22日目	TIL	144.8±55.4	9,583.2±420.6	25,185.6±693.0	33,554.7±698.2
	PBL	3,014.4±246.0	12,708.4±489.8	14,120.5±702.5	14,413.8±76.5
28日目	TIL	113.7±59.7	1,754.0±122.7	5,513.8±222.1	8,129.7±230.8
	PBL	247.8±30.0	6,201.0±277.9	7,230.3±199.4	8,066.3±434.9

症例12において、350JRU/ml の rIL-2 で培養中の TIL および PBL の、培養13、22および28日目の rIL-2 に対する増殖反応をそれぞれ3日間の培養で ³H-TdR の取り込み量 (CPM) を測定し比較検討した。
³H-TdR の取り込み量 (CPM) はそれぞれ triplicate で測定した値を MEAN±SE で表示した。

その結果、長期間培養された TIL は低濃度の IL-2 には反応しづらくなるが、その反応性は濃度依存性に増強された。この反応態度は、同一個人の PBL でも同様の傾向がみられたが、TIL において著明であった。このことより、TIL は IL-2 濃度依存性に PBL より効率よく増殖することが示された。

2) TIL の細胞障害活性 (NK および LAK 活性) の経時的变化

標的細胞として NK 活性の測定に K562 を、LAK 活性の測定には NA を用いて、4 時間の ⁵¹Cr release assay 法で細胞障害活性を測定し、TIL および PBL の NK および LAK 活性の経時的な変化を観察した (図 4)。その結果、IL-2 で培養することにより TIL から NK

活性の増強および LAK 活性の出現が認められた。とくに培養 3 週目以降では TIL の NK、LAK 両活性は PBL のそれを上回るようになり、その活性は 8 週目以降まで維持された。NK および LAK 活性がピークに達する時期は、TIL では培養 3 週、PBL では培養 2 週で、TIL が PBL よりも遅れる傾向であった。

3. IL-2 の腫瘍局所投与による TIL の細胞障害活性 (NK および LAK 活性) の誘導

術前治療として腫瘍切除の前に IL-2 の局所投与を行った症例の切除標本より TIL を分離し、分離回収直後の新鮮 TIL の NK および LAK 活性を測定し、IL-2 非投与症例と比較検討を行った (図 5)。IL-2 非投与例の新鮮 TIL は、NK および LAK 活性がほとんど認め

られず、PBLと比較して特にNK活性は抑制されていた。一方、IL-2局所投与例の新鮮TILでは、PBLとともにNK活性の増強およびLAK活性の出現が認められ、PBLよりも高値を示す症例もみられた。PBLのNK活性にのみ、IL-2投与例と非投与例で有意差が認められたが($P<0.01$)、TILでは両者間に有意差は認められなかった。IL-2局所投与例のTILの細胞障害活性は、症例によりかなりばらつきがみられた。とくに症

例16のようにTILのNK活性が78.8%と、PBLよりも高値を示す症例もあれば、症例14のTILのようにNKおよびLAK活性ともにほとんど示さない症例が確認された。ここでは特にIL-2の局所投与量との関連性はなかった。

4. 抗CD3抗体/IL-2で培養中のTILおよびLN-TILの細胞増殖能と細胞障害活性

1) 細胞数の推移と培養日数

固相化抗CD3抗体およびIL-2の培養によるTILおよびLN-TILの細胞増殖能を観察した(図6)。その結果、最大増殖率は、TIL, LN-TIL, PBLでそれぞれ平均 $2,091.6 \pm 2,998.1$ 倍, $549.4 \pm 1,056.0$ 倍, $3,671.3 \pm 3,487.7$ 倍を示し、それぞれIL-2単独で培養した場合と比較して数十倍から数百倍上回る値であった。細胞数が最大に達するまでの日数は、TIL, LN-TIL, PBLでそれぞれ平均 21.3 ± 8.7 日, 20.5 ± 6.0 日, 23.4 ± 6.5 日であり、IL-2単独で培養した症例と差異はなかった。TILおよびLN-TILの最大獲得細胞数は、TILでは $6.90 \times 10^6 \sim 2.80 \times 10^9$ の範囲で平均 9.00×10^8 個、LN-TILでは $3.13 \times 10^8 \sim 7.96 \times 10^9$ の範囲で平均 2.90×10^9 個であった(表2)。

2) TILおよびLN-TILの細胞障害活性(NKおよびLAK活性)の経時的変化

固相化抗CD3抗体およびIL-2で培養することによりTIL, LN-TILからNK活性の増強およびLAK活性の出現が認められた(図7)。NKおよびLAK活性がピークに達する時期は、平均でPBLでは培養2週であるのに対しTIL, LN-TILでは培養3週であった。

図4 IL-2活性化TILおよびPBL(LAK)の細胞障害活性の経時的変化。

rIL-2局注症例: rIL-2 $8.4 \sim 29.4 \times 10^6$ JRU局注

図5 IL-2の腫瘍局所投与による新鮮TILのNKおよびLAK活性の増強。

図 6 抗 CD3 抗体/IL-2 活性化 TIL, LN-TIL および PBL (CD3・LAK) の細胞増殖能。
図中の数字は症例番号を示す。

図 7 抗 CD3 抗体/IL-2 活性化 TIL, LN-TIL および PBL (CD3・LAK) の細胞障害活性の経時的変化。

TIL, LN-TIL と PBL の NK および LAK 活性値の平均はほぼ同程度であったが、TIL, LN-TIL の群で高い NK および LAK 活性が維持される症例が認められ

た。

5. IL-2 あるいは抗 CD3 抗体/IL-2 活性化 TIL および LN-TIL の自己腫瘍細胞に対する細胞障害活性

1) 自己培養腫瘍細胞株に対する TIL の細胞障害活性

自己培養腫瘍細胞株が樹立された症例 8 (扁平上皮癌) と症例 12 (横紋筋肉腫) について、自己培養腫瘍細胞に対する IL-2 活性化 TIL の細胞障害活性を検討した。IL-2 活性化 TIL および PBL (LAK) はともに凍結融解した後培養 4 日目の細胞を用いた (表 4)。

その結果、症例 8 においては、培養 23 日目の TIL は K562 に対する細胞障害活性を示すのみで、自己培養腫瘍細胞 (OM-1) をはじめ他の培養腫瘍細胞に対する細胞障害活性は認められなかった。一方、症例 12 の培養 13 日目および 28 日目の TIL は K562 に対する高い細胞障害活性を示すとともに、自己培養腫瘍細胞 (RS-1) に対して同種の培養腫瘍細胞より高い細胞障害活性を示した (表 5)。

これと比較して、症例 8、症例 12 ともに PBL (LAK) は自己培養腫瘍細胞に対してまったく細胞障害活性を示さなかった。

2) 自己新鮮腫瘍細胞に対する TIL および LN-TIL の細胞障害活性

分離直後に凍結保存された自己新鮮腫瘍細胞に対する IL-2 活性化 TIL の細胞障害活性は症例 12 (横紋筋肉

表 4 凍結融解細胞の細胞増殖率および Viability

	IL-2 活性化細胞	回収細胞数(/g) (Viability%)	細胞増殖率(倍) (4日間)	Viability(%)
症例 8. 黒色腫	PBL (Day 23)	6.40×10^6 (73.4)	0.49	95.1
	TIL	8.85×10^6 (80.0)	0.69	95.2
症例 12. 黒色腫	PBL (Day 13)	0.94×10^6 (17.8)	0.34	96.7
	TIL	2.22×10^6 (44.4)	2.01	94.9
	TIL (Day 28)	28.65×10^6 (90.3)	0.21	95.3

融解後のリンパ球は 700 JRU/ml の IL-2 で 4 日間培養され、細胞障害活性の測定に供した。
4 日間培養後のリンパ球の Viability は、TIL, PBL ともに良好であった。

表 5 IL-2 活性化 TIL の自己培養腫瘍細胞株に対する細胞障害活性（4 時間の ⁵¹Cr 遊離試験）

IL-2 活性化細胞	症 例	標的細胞（細胞障害活性：%Lysis <E/T=20>, Lytic units)							
		OM-1		RS-1		NA		K562	
		% Lysis	LU	% Lysis	LU	% Lysis	LU	% Lysis	LU
TIL	8(D-23)	6.5	<0.01	0.3	<0.01	4.4	<0.01	36.1	10.1
	12(D-13)	45.7	20.2	54.4	64.1	48.6	19.8	69.7	704.1
	(D-28)	75.7	33.4	72.1	84.4	77.0	45.2	78.9	3,387
PBL (LAK 細胞)	8(D-23)	4.6	<0.01	1.7	N.D	3.7	<0.01	46.0	16.3
	12(D-13)	N.T	N.T	1.7	N.D	N.T	N.T	N.T	N.T

——は自己培養腫瘍細胞に対する細胞障害活性を示す。
TIL および PBL は 350 JRU/ml の IL-2 で培養された。（ ）内は培養日数を示す。細胞障害活性の測定は、融解後 4 日目に行われた。
N.D: E/T=20 のみ測定のため、LU は算出せず。
N.T: 測定せず。

表 6 活性化 TIL, LN-TIL および PBL の自己新鮮腫瘍細胞に対する細胞障害活性

症例	EFFECTOR 細胞*	標的細胞（細胞障害活性：%Lysis <E/T=20>, Lytic units(LU), total (LU)								
		自己新鮮腫瘍細胞			NA			K562		
		%Lysis	LU	total LU	%Lysis	LU	total LU	%Lysis	LU	total LU
12	(TIL+IL-2) _{13d}	24.1	3.7	69.0	46.4	19.2	3.6×10^2	83.7	4.0×10^3	7.4×10^4
	(PBL+IL-2) _{13d}	12.8	0.7	8.7	39.9	14.5	1.7×10^2	78.6	1.0×10^2	1.3×10^3
28	(LN-TIL+CD3/IL-2) _{14d}	20.1	3.1	87.4	11.4	1.1	30.0	46.7	15.7	4.4×10^2
	(PBL+CD3/IL2) _{14d}	10.9	0.1	3.0	13.0	1.0	24.0	66.4	34.9	8.6×10^2

* 症例12は 350 JRU/ml の IL-2 単独で13日間培養された細胞、症例28は 700 JRU/ml の IL-2 と培養初期 7 日間固相化抗 CD3 抗体で刺激し、14日間培養された細胞を用いた。

腫)で、抗 CD3 抗体/IL-2 活性化 LN-TIL の細胞障害活性は症例28(悪性黒色腫)で検討した(表6)。
その結果、自己新鮮腫瘍細胞に対して培養 13 日目の IL-2 活性化 TIL は、%lysis で LAK の約 2 倍、単位細胞当りの細胞障害活性 (lytic units) では LAK の約 5 倍の細胞障害活性を示した。また培養14日目の抗 CD3 抗体/IL-2 活性化 LN-TIL も %lysis で LAK の約 2 倍の、lytic units では LAK の約30倍の細胞障害活性を

示した。また、これらに増殖細胞数を加味した全細胞障害活性 (Total lytic unit) で比較した場合、TIL および LN-TIL の自己新鮮腫瘍細胞に対する細胞障害活性は、自己の PBL よりも数段高い活性を示し、自己腫瘍細胞に対する細胞障害活性の選択性が示された。

考 察

リンパ球をインターロイキン-2 (IL-2) で培養して得られる lymphokine-activated killer (LAK) 細胞は、NK 活性に抵抗性を示す新鮮固形腫瘍細胞に対して非特異的な細胞障害活性を示すキラー細胞として1982年 Grimm⁸⁾により定義された。癌に対する免疫療法の1つとして、近年、この LAK 細胞を用いた養子免疫療法が行われるようになり、他の治療法が無効であった進行癌症例に対して有効であった症例も報告されている²³⁾。またこの養子免疫療法の効果を増強する目的で、LAK 細胞の細胞障害活性を増強させるための培養法¹¹⁾や投与法 (投与経路および併用療法としての投与のタイミング) の検討^{24,25)}が行われている。さらに腫瘍組織に浸潤しているため、腫瘍細胞を選択的に、あるいは特異的に障害することのできる可能性があると考えられるリンパ球を用いることが考えられてきている。

そこで口腔悪性腫瘍患者から分離した TIL および LN-TIL の細胞障害活性や細胞増殖能などの機能を検索し、口腔悪性腫瘍患者に対する養子免疫療法の移入細胞としての有用性を検討することは有意義であると考えられる。

1. TIL および LN-TIL の分離結果について

本研究において、検索対象の口腔原発悪性腫瘍組織28検体 (扁平上皮癌22例、悪性黒色腫2例、横紋筋肉腫、骨肉腫、粘表皮癌、腺様嚢胞癌がそれぞれ1例ずつ) および転移リンパ節組織 (扁平上皮癌5例、悪性黒色腫1例) 6例全例からリンパ球を分離回収することができた。

リンパ球の回収率については、当教室の杉山²⁶⁾は酵素処理を行わずに機械的方法でのみリンパ球を分離し、TIL では平均 0.89×10^6 個/g、LN-TIL では平均 22.62×10^6 個/gの細胞数を回収している。今回酵素処理によって分離された TIL の実験結果と比較すると、酵素処理をすることにより、TIL の回収細胞数の増加が期待できるものと考えられた。

細胞分離回収時のリンパ球腫瘍細胞比 (L/T 比) の検討では、それぞれの検体ではほとんどが腫瘍細胞数を上回る数のリンパ球が認められ、TIL では $0.5 \sim 7.6$ で平均 2.84 ± 2.12 であった。これは転移性メラノーマの症例で 1.26 ± 1.72 ²⁷⁾あるいは 0.40 ± 0.37 ²⁸⁾、腎細胞癌の症例では 1.87 ± 1.04 ²⁹⁾あるいは腫瘍細胞混入率 $39.1 \pm 3.3\%$ ³⁰⁾などの報告例と比較してより高い数値であり、口腔

悪性腫瘍での TIL の浸潤度の高さがうかがわれた。さらに LN-TIL の L/T 比は $3.8 \sim 16.9$ で平均 12.68 ± 5.20 であり、TIL との間に有意差がみられ転移リンパ節組織では腫瘍細胞の混入率が低く、効率よく LN-TIL が分離されることが示された。

TIL の回収細胞数に影響を及ぼす因子としては、特に原発腫瘍組織型と LI-grade があげられ、TIL の回収率は非上皮性腫瘍である横紋筋肉腫、悪性黒色腫で高く、LI-grade の高い腫瘍で高い傾向が認められた。LI-grade と TIL の回収率の関係については、杉山²⁶⁾も同様の結果を報告しており、組織標本上で単核細胞浸潤が多く認められる腫瘍では、TIL の回収率は高い傾向が示された。

2. IL-2 単独培養による TIL の細胞増殖能および細胞障害活性について

今回の実験結果から IL-2 存在下での培養により、TIL の増殖率は PBL よりも数倍高いことが示された。Itoh²⁸⁾は転移性メラノーマ、肉腫および腎細胞癌から TIL を分離し、 140 JRU/ml の IL-2 存在下の培養で TIL の増殖率を測定し、その結果それぞれ $1,543 \pm 932$ 倍、 $5,413 \pm 1,899$ 倍、 $1,065 \pm 246$ 倍であり、培養日数も40日を越え、今回口腔悪性腫瘍より分離された TIL と比較して10倍以上の増殖率が認められている。中でも肉腫からの TIL は他の2種の TIL と比べて最も高い増殖率を示していた。今回 IL-2 単独で培養された20例のうち、最も高い増殖率 (890倍、37日) を示した症例12は横紋筋肉腫であった。頭頸部領域の腫瘍より分離された TIL の報告^{31,32)}ではそのほとんどが扁平上皮癌より分離されたものであり、増殖率は平均して100倍程度であり PBL の増殖率より高い値を示していた。今回の結果もこれらの報告例とはほぼ同様の傾向であり、TIL の IL-2 に対する反応性は分離される腫瘍組織型によって異なる傾向が示唆された。

TIL の細胞障害活性については、IL-2 での培養により数日で NK および LAK 活性を示すようになる³³⁾。この活性がピークに達するのは培養後3週目で、培養2週目に活性のピークがある PBL と比較して遅れて出現する傾向であった。この理由として、TIL では IL-2 レセプター (IL-2R) の発現がほとんどないこと³⁴⁻³⁶⁾や、腫瘍細胞が IL-2 に対する反応性をはじめ PHA や ConA のようなマイトジェンに対する TIL の反応性を抑制している可能性³⁵⁾が考えられた。

一方、TIL には NK 細胞がほとんど観察されず T 細胞が優位であることが知られており^{27,30,32,34,36)}、このことより IL-2 により活性化された TIL は heterogeneous ではあるが大部分で T 細胞由来の LAK 活性を示している可能性も考えられた。また当教室の東³⁷⁾は LAK 前駆細胞の検索で、PBL から NK 細胞分画 (Leu 4-11⁺, Leu 4-7⁺) と T 細胞分画 (Leu 4⁺11-7⁻) からの LAK

活性の誘導を行い、短期培養（培養7日目）ではNK細胞分画からの強いNKおよびLAK活性が認められ、長期培養（培養20日目）によりT細胞分画からもNKおよびLAK活性が認められるようになることを報告しており、今回の実験で、TILの細胞障害活性が増強される時期が同報告のT細胞分画のものと同様の傾向を示していた。ゆえにこれらの理由から、PBLから誘導されたLAK細胞と比較して、TILの細胞障害活性が遅れて出現し長期間維持される現象は、IL-2で活性化されたTILがT細胞分画由来である可能性を示唆している。

3. IL-2の腫瘍局所投与によるTILの細胞障害活性の誘導について

先に述べたように腫瘍組織から分離された直後の新鮮TILはNK活性の抑制^{26,38,39}をはじめ、LAK活性、および自己腫瘍細胞障害活性とも低いことが報告されている^{28,30,31,40-42}。また、TILではIL-2Rの発現はほとんどなく、IL-2に対する反応性は抑制されているとの報告³⁴⁻³⁶が多い。この理由として、サブプレッサーT細胞の混在^{27,43}、腫瘍組織の産生する因子によるサブプレッサーT細胞の活性化⁴⁴、またこの因子による直接的なTILの機能抑制³⁵などが考えられる。これに対して伊東ら⁴⁵は、メラノーマ内のTILの少なくとも一部は自己腫瘍細胞を認識したCTL precursorもしくはimmature CTLであり、腫瘍局所においてIL-2の供給が不十分のためにCTL precursorにとどまざるを得ないと推論している。

今回の検索結果も諸家の報告と同様であり、分離回収直後のTILのNKおよびLAK活性はほとんど認められなかった。しかし、腫瘍切除前にIL-2の局所投与を行った症例では、非投与例と比較してTILのNKおよびLAK活性は高い傾向を示した。さらに、IL-2局所投与例の腫瘍では臨床的にも腫瘍縮小効果が認められ、腫瘍局所には著しい炎症性細胞浸潤の出現がみられ、その主体はリンパ球および形質細胞であった^{46,47}。このことより、*in vivo*においてIL-2の局所投与によりTILの細胞障害活性が増強されることが示唆されるとともに、TIL中の細胞障害性T細胞の前駆細胞を、腫瘍特異的あるいは非特異的な細胞障害性T細胞へ分化・増殖させる可能性をもつことも推測された^{41,48}。

4. 抗CD3抗体/IL-2での培養によるTILおよびLN-TILの細胞増殖能ならびに細胞障害活性について

TIL中のT細胞をより選択的に増殖させる目的で抗CD3抗体を用いた実験を行い、抗CD3抗体/IL-2で培養中のTILの細胞増殖能と細胞障害活性について検討し、口腔悪性腫瘍者に対する養子免疫療法の移入細胞として有用性について検討した。

PBLをT細胞レセプター複合体(TCR/CD3 complex)

に対するモノクローナル抗体（抗CD3抗体）とIL-2で刺激すると長期培養（14日から21日）により、LAK活性を維持したまま数百倍の細胞増殖が起こることが知られている^{14,15}。またTILからも培養初期に固相化した抗CD3抗体刺激によりCD8優位なT細胞が効率よく増殖することが報告されている^{16,49}。さらに、固相化抗CD3抗体によりTILのIL-2Rの発現率が増加するとともに、IL-2産生能も増強されることが報告されている¹⁸。

今回の検索結果からはTIL、LN-TILおよびPBLのどの細胞からも抗CD3抗体およびIL-2により細胞増殖が認められその程度は、20日間から23日間でそれぞれ $2,091 \pm 2,998$ 倍、 $549 \pm 1,056$ 倍、 $3,671 \pm 3,487$ 倍で、IL-2単独培養の場合と比べて数十倍から数百倍上回る増殖率であった。これは、IL-2単独で培養した場合と比較して、それぞれPBLでは約160倍、TILでは約16倍の増殖率が増強されていた。このことより、抗CD3抗体の刺激によりT細胞表面のIL-2Rの発現が増強され、IL-2に対する反応性が増大し、結果的に高い細胞増殖能が観察されたものと考えられた。

細胞障害活性の経時的な変化では、PBLではNKおよびLAK活性のピークが2週目であるのに対し、TIL、LN-TILでは3週目であり、PBLより遅れて増殖する傾向であった。とくにNK活性は4週後でも非常に高い活性を示していた。この結果は、IL-2単独で培養した場合と同じであったが、前述した報告例のように、抗CD3抗体で刺激されていることから、この増殖してきた細胞はT細胞優位と考えられ、自己腫瘍細胞に対する細胞障害活性を有する可能性が示唆された。実際にPisani⁵⁰らは肺癌患者（非小細胞癌）から分離されたTILが抗CD3抗体とIL-2により活性化され自己新鮮腫瘍細胞に対する細胞障害活性が増強され得ることを報告している。そこで次に、IL-2あるいは抗CD3抗体/IL-2活性化TIL、LN-TILの自己腫瘍細胞に対する細胞障害活性について検討を行った。

5. TILおよびLN-TILの自己腫瘍細胞に対する細胞障害活性について

自己培養腫瘍細胞に対するIL-2活性化TILの細胞障害活性については、症例8の培養23日目凍結保存されたIL-2活性化TILは、NK活性は温存されていたものの、自己腫瘍細胞障害活性を始め同種腫瘍細胞に対するLAK活性は消失していた。これは自己のPBLにおいても同じ結果であった。一方、症例12においては、培養13日目および28日目凍結保存されたIL-2活性化TILは両者ともに、高いNK活性を示すとともに、他の同種培養固型腫瘍細胞と比較して自己腫瘍細胞に対する選択的な細胞障害活性を示した。ここでは融解時の細胞の生細胞率(viability)や融解後の培養中の細胞増殖能との関連性はみられなかった。

TIL の自己腫瘍細胞に対する細胞障害活性の検討では腎癌由来の TIL²⁸⁻³⁰⁾や、頭頸部扁平上皮癌由来の TIL^{31,32)}においては、必ずしも転移性メラノーマ腫瘍由来の TIL²⁷⁾が示したような、自己腫瘍特異的な細胞障害活性を示しているとは限らない。しかし症例によっては自己腫瘍に選択的な活性を有する TIL も認められ、由来する腫瘍組織のみでなく、個体によってもその性状が異なることが考えられた。

自己新鮮腫瘍細胞に対する細胞障害活性については、症例12は IL-2 単独培養、症例28は抗 CD3 抗体/IL-2 培養であるが、両者ともに活性化 TIL および LN-TIL は自己新鮮腫瘍細胞に対して障害活性を示した。つまり、症例12の培養13日目の TIL は K562 に対しては同一条件で培養した自己の PBL と同様の NK 活性を示す一方自己腫瘍に対しては PBL より高い値を示し、症例28では、培養14日目の抗 CD3 抗体/IL-2 活性化 LN-TIL は同一条件で培養した自己の PBL と比較して NK 活性が低いにもかかわらず、自己新鮮腫瘍細胞に対しては数倍高い細胞障害活性を示し、自己新鮮腫瘍細胞に対する選択的な細胞障害活性が認められた。一方、PBL から IL-2 により誘導された LAK 細胞の自己新鮮腫瘍細胞に対する細胞障害活性の報告⁵¹⁾では、10例中6例に活性が認められているが、この活性は同種の樹立腫瘍細胞株 (K562, NA, Daudi) に対しても細胞障害活性を有する非特異的な細胞障害活性であった。

TIL のエフェクター細胞としての免疫細胞学的な位置づけについて考察をしてみると、癌細胞に対して障害性をもつリンパ球は次の3つに分類することができる⁵²⁻⁵⁴⁾。すなわち、1) Antigen-specific, MHC-restricted CTL, 2) Non-MHC restricted cytotoxic T lymphocytes, 3) NK cells である。1) は細胞表面に発現されている TCR/CD3 複合体によって標的細胞を認識し障害し、それは MHC に拘束されている。2) は細胞表面に TCR/CD3 複合体を発現しているが、その細胞障害活性は MHC 非拘束である。3) は TCR/CD3 複合体が欠如しており細胞障害活性は MHC 非拘束性であり、細胞表面に CD16 あるいは NKH1 を発現している。われわれが PBL から抗 CD3 抗体/IL-2 で培養して得られた CD3・LAK の細胞障害機序は TCR/CD3 複合体を介しているものと、NK 様の TCR/CD3 複合体を介さないものの2つの異なった機序が関与している可能性のあることを報告した⁵⁵⁾。

今回 TIL および LN-TIL を IL-2 あるいは抗 CD3 抗体/IL-2 で培養して得られた活性化細胞は、その細胞障害活性は LAK 様であったが、自己腫瘍細胞に対する選択性は PBL から活性化されたいわゆる LAK と比較した場合にあきらかに強く認められた。頭頸部以外の領域では、進展肺癌患者の胸水より得られたリンパ球 (TIL) の機能の検索や⁴²⁾、産婦人科領域悪性腫瘍の TIL

の検索^{56,57)}で、IL-2 による CD8⁺ TIL の増加と新鮮自己腫瘍細胞に対する細胞障害活性の増強が認められ、また腎細胞癌の TIL では⁵⁸⁾ MHC クラス I 拘束性の CTL の誘導の可能性について報告されており、TIL の自己腫瘍細胞に対する細胞障害活性が認められている。

6. TIL の臨床応用に際しての問題点

このように TIL の養子免疫療法の移入細胞としての有用性が示された反面、実際に臨床応用にあたり次のような問題点が残されている。

1) 消化器の一種である口腔は体外と連絡を有する場合が多く、常に細菌汚染にさらされている。このため TIL の長期培養による細菌増殖の可能性が高い。2) すべての症例から TIL が得られるとは限らない。3) 腫瘍を混じった状態で TIL を培養するため、TIL に細胞障害活性が誘導されない場合、腫瘍細胞が細胞移入時に残存する可能性がある。

以上の問題点に関して、菅ら⁵⁹⁾は1) に対しては消化器癌、乳癌原発巣からの TIL 使用の断念一所属リンパ節リンパ球の積極的使用、3) に対しては、培養系への TCGF の添加を行っている。われわれの今回の実験結果からは、分離・培養の過程で細菌汚染を起こしたものは5例あり、すべて口腔原発巣から得た TIL であり、LN-TIL で細菌汚染を起こしたものは1例もなかった。また、回収細胞数および最大獲得細胞数からみても、LN-TIL はより優れており、積極的に LN-TIL を使用することが問題点 (1), (2) の対策になるものと考えられた。(3) については、Itoh ら²⁸⁾は 140 JRU/ml の IL-2 で培養中の melanoma の TIL 12例のうち3例に腫瘍細胞の残存がみられたが、4週目までに消失したと述べている。また堀ら⁶⁰⁾も TCGF を用いた癌性胸水の培養では全例9日目までに癌細胞が消失したことを報告している。われわれの結果からも 140~700 JRU/ml の IL-2 存在下で TIL が増殖した症例では、トリパンブルー染色でみる限りでは、少なくとも14日目までには腫瘍細胞は消失していたが、今後実際に TIL を臨床応用に当たり詳細な検討が必要と思われた。

今後、口腔悪性腫瘍患者において、TIL の標的細胞認識についての検討を行いその性状をあきらかにするとともに、細胞間接着分子の関与⁶¹⁾についての検討が重要な課題と考えられる。また、実際に臨床投与した場合の体内動態⁶²⁾の検討や、併用療法の検討など、腫瘍集積性の検討が TIL を用いた養子免疫療法を成功に導く要素となるものと考えられた。

結 語

口腔悪性腫瘍患者より腫瘍組織浸潤リンパ球を分離し、IL-2 による *in vitro* での細胞増殖能および細胞障害活性の増強を試み、抗腫瘍活性誘導の可能性について

検討した。また、術前治療として腫瘍切除前に腫瘍組織周囲に IL-2 の局所投与を行い、切除標本より分離された新鮮 TIL の細胞障害活性 (NK および LAK 活性) を測定し、IL-2 の腫瘍局所投与による TIL の細胞障害活性誘導について検討した。さらに、T 細胞を選択的に増殖させることを目的として、抗 CD3 抗体および IL-2 を用いて TIL および LN-TIL について同様の検索を行い、養子免疫療法の移入細胞としての有用性について検討した。

その結果、以下のことが示された。

1. 口腔原発悪性腫瘍組織 (28 検体) および 転移リンパ節組織 (6 検体) 全例から、TIL および LN-TIL の分離が可能であった。回収率、L/T 比ともに LN-TIL の値が有意に高値を示し、TIL と比較して効率よく回収されることが示された。

また、TIL の回収率は横紋筋肉腫、悪性黒色腫のような非上皮性腫瘍で高く、術前治療の施行されない腫瘍で高い傾向であった。さらに、LI grade の高い腫瘍では TIL の回収率は高かった。

2. IL-2 単独での培養により、TIL は PBL と比較して高い増殖能を示した。TIL の最大獲得細胞数は、 $2.18 \times 10^6 \sim 3.56 \times 10^9$ の範囲で、平均 3.17×10^7 個であった。

また TIL の細胞増殖反応は IL-2 濃度依存性に増強し、PBL より効率よく増殖することが示された。

さらに TIL から NK および LAK 活性の出現、増強が認められ、その活性は平均で培養 3 週目以降で PBL を上回るようになり、その後も長期間維持された。

3. 口腔悪性腫瘍組織から分離された新鮮 TIL は、NK および LAK 活性をほとんど示さなかった。一方、術前治療として腫瘍切除前に IL-2 の局所投与を行った症例では、新鮮 TIL の NK 活性の増強および LAK 活性の出現が認められた。

4. 抗 CD3 抗体/IL-2 での培養により、TIL および LN-TIL は PBL と同様に高い増殖能を示し、それぞれ IL-2 単独で培養した場合と比較して数十倍から数百倍上回る値であった。TIL および LN-TIL の最大獲得細胞数は、TIL では 6.90×10^6 個 $\sim 2.80 \times 10^9$ 個の範囲で平均 9.00×10^8 個、LN-TIL では 3.13×10^8 個 $\sim 7.96 \times 10^9$ 個の範囲で平均 2.90×10^9 個であった。また、その NK および LAK 活性は PBL とほぼ同程度の値であったが、症例によりその NK および LAK 活性は 3 週目以降で PBL を上回りその後も維持されることが示された。

5. IL-2 活性化 TIL が培養自己腫瘍細胞 (上顎洞、横紋筋肉腫) および新鮮自己腫瘍細胞 (上顎洞、横紋筋肉腫) に対して障害活性を示す症例、および抗 CD3 抗体/IL-2 活性化 LN-TIL が新鮮自己腫瘍細胞 (口蓋、悪性黒色腫) に対する障害活性を示す症例が認められ、

TIL および LN-TIL が自己腫瘍細胞に対して選択的な細胞障害活性を有する可能性が示唆された。

以上の結果より、口腔悪性腫瘍組織に浸潤している TIL から IL-2 による細胞障害活性 (NK, LAK 活性および自己腫瘍細胞障害活性) の誘導が可能であった。また IL-2 の腫瘍局所投与により、TIL の細胞障害活性が生体内で増強する可能性が示唆された。さらに抗 CD3 抗体および IL-2 での培養により、TIL および LN-TIL の細胞増殖能および細胞障害活性が増強されることから、口腔悪性腫瘍患者に対する養子免疫療法の移入細胞としての有用性が示された。

稿を終えるにあたり、ご懇切なるご指導、ご校閲を賜りました榎本昭二教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究に際し終始ご懇切なるご指導とご助言を頂きました高橋雄三博士に心から感謝の意を表します。さらにご協力を頂きました口腔外科学第 2 講座教室員の皆様に心からの謝意を表します。

本論文の要旨は、第 46 回日本癌学会総会 (昭和 62 年 9 月 7 日、東京)、第 12 回日本頭頸部腫瘍学会 (昭和 63 年 7 月 7 日、神奈川)、第 7 回日本歯科薬物療法学会 (昭和 63 年 7 月 23 日、大阪)、第 1 回 JBRM 学会学術集会総会 (昭和 63 年 11 月 12 日、大阪)、FIRST ASIAN CONGRESS-ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY (16-19 March 1989, Manila, Philippines)、第 34 回日本口腔外科学会総会 (平成元年 10 月 27 日、郡山)、第 35 回日本口腔外科学会総会 (平成 2 年 10 月 25 日、岡山) において発表した。

引用文献

- 1) Handley, W.S.: The pathology of melanotic growth in relation to their operative treatment. *The Lancet* 6: 927-933 1907.
- 2) Black, M.M., Opler, S.R., et al.: Microscopic structure of gastric carcinomas and their regional lymph nodes in relation to survival. *Surg Gynecol Obstet* 98: 725-734 1954.
- 3) 藤林孝司: 口腔癌における細胞性免疫反応に関する研究. *口科誌* 32: 657-695 1983.
- 4) Hiratuka, H., Imamura, M., et al.: Lymphocytes subpopulations and T-cell subsets in human oral cancer tissues: Immunohistologic analysis by monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol* 81: 464-470 1984.
- 5) Hiratuka, H., Imamura, M., et al.: Immunohistologic detection of lymphocytes subpopulations infiltrating in human oral cancer with special reference to its clinical significance. *Cancer* 53: 2456-2466 1984.
- 6) Morgan, D.A., Ruscetti, P.W., et al.: Selective

- in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. Science 193: 1007-1008 1976.
- 7) 羽室淳爾: インターロイキン. 講談社サイエンティフィック, 東京, 1984, 110-120頁.
 - 8) Grimm, E.A., Mazumder, A., et al.: 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.
 - 9) Rosenberg, S.A.: Adoptive immunotherapy of cancer. Accomplishments and prospects. Cancer Treat Rep 68: 233-255 1984.
 - 10) 石川 隆, 井堀道夫, 他: IL-2 による癌の免疫療法—LAK 細胞注入療法—. Medical Immunol 12: 767-773 1986.
 - 11) 仁井昌彦, 曾根三郎, 他: Lymphokine activated killer (LAK) 細胞による養子免疫療法. 癌と化学療法 14: 1871-1876 1987.
 - 12) Rosenberg, S.A., Spiess, P., et al.: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. Science 233: 1318-1321 1986.
 - 13) Rosenberg, S.A., Packard, B.S., et al.: Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. New Engl J Med 319: 1676-1680 1988.
 - 14) Ochoa, A.C., Gromo, G., et al.: Long-term growth of lymphokine-activated killer (LAK) cells: role of anti-CD3, β -IL1, interferon- γ and β . J Immunol 138: 2728-2733 1987.
 - 15) Ochoa, A.C., Hasz, D.E., et al.: Lymphokine-activated killer activity in long-term cultures with anti-CD3 plus interleukin 2: identification and isolation of effector subsets. Cancer Res 49: 963-968 1989.
 - 16) 関根輝彬, 垣添忠生, 他: Tumor-Infiltrating Lymphocytes の培養と Adoptive Immunotherapy への応用. 癌と化学療法 16: 1469-1473 1989.
 - 17) 関根輝彬: 固相化 CD3 抗体により活性化した T cell (CD3-AT) を用いた養子免疫療法. BIOTHERAPY 4: 1606-1613 1990.
 - 18) Schoof, D.D., Selleck, C.M., et al.: Activation of human tumor-infiltrating lymphocytes by monoclonal antibodies directed to the CD3 complex. Cancer Res 50: 1138-1143 1990.
 - 19) Van Wauwe, J.P., De Mey, J.R., et al.: OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. J Immunol 124: 2708-2713 1980.
 - 20) Black, M.M., Speer, F.D., et al.: Structural representations of tumor-host relationships in mammary carcinoma. Biologic and prognostic significance. Am J Clin Pathol 26: 250-265 1956.
 - 21) 矢田純一, 藤原道夫: リンパ球機能検査法. 中外医学社, 東京, 1983, 15-24頁.
 - 22) Cerottini, J.C., Engers, H.D., et al.: Generation of cytotoxic T lymphocytes *in vitro*. I Response of normal and immune mouse spleen cells in mixed leukocyte cultures. J Exp Med 140: 703-717 1974.
 - 23) 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. New Eng J Med 316: 889-897 1987.
 - 24) 高橋雄三, 森 良之, 他: 口腔癌患者における抗 CD3 抗体および IL-2 活性化自己リンパ球 (LAK 細胞) の腫瘍集積性ならびに体内動態の観察. 日口外誌 37: 1249-1263 1991.
 - 25) 高橋雄三, 湊 秀次, 他: LAK 細胞障害活性 (NK および LAK 活性) ならびに細胞増殖に対する放射線照射の影響. 頭頸部腫瘍 17: 187-192 1991.
 - 26) 杉山芳樹: 口腔癌組織浸潤リンパ球の免疫学的研究. 日口外誌 29: 30-46 1983.
 - 27) Itoh, K., Tilden, A.B., et al.: Interleukin-2 activation of cytotoxic T-lymphocytes infiltrating into human metastatic melanomas. Cancer Res 46: 3011-3017 1986.
 - 28) Itoh, K., Platsoucas, C.D., et al.: Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. Activation by interleukin 2 and autologous tumor cells, and involvement of the T cell receptor. J Exp Med 168: 1419-1441 1988.
 - 29) 川上一岳, 大内明夫, 他: インターロイキン 2 (IL-2) により活性化された腎細胞癌浸潤リンパ球 (TIL) の免疫学的性状. BIOTHERAPY 4: 1780-1786 1990.
 - 30) Beldegrun, A., Muul, L.M., et al.: Interleukin 2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer: isolation, characterization, and anti tumor activity. Cancer Res 48: 206-214 1988.
 - 31) 宮田佳代子, 湯山誠一朗, 他: 頭頸部癌患者の tumor infiltrating lymphocytes (TIL) の増殖能と抗腫瘍活性. 頭頸部腫瘍 15: 73-78 1989.
 - 32) Hoe, D.S., Whiteside, T.L., et al.: Long-term interleukin 2-dependent growth and cytotoxic activity of tumor-infiltrating lymphocytes from human squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer Res 47: 6353-6362 1987.
 - 33) 森 良之, 高橋雄三, 他: 腫瘍組織浸潤リンパ球 (TIL) からの rIL 2 による細胞障害活性の

- 誘導. *BIOThERAPY* 3: 80-84 1989.
- 34) Whiteside, T.L., Miescher, S., et al.: Separation, phenotyping and limiting dilution analysis of T-lymphocytes infiltrating human solid tumors. *Int J Cancer* 37: 803-811 1986.
 - 35) Miescher, S., Whiteside, T.L., et al.: Functional properties of tumor-infiltrating and blood lymphocytes in patients with solid tumors: effect of tumor cells and supernatants on proliferative responses of lymphocytes. *J Immunol* 136: 1899-1907 1986.
 - 36) Whiteside, T.L., Heo, D.S., et al.: Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes from human solid tumors in interleukin-2. *Cellular Immunotherapy of Cancer*. Alan Liss, Inc., New York, 1987, p 213-222.
 - 37) 東みゆき: 口腔癌患者における IL-2 活性化キラー細胞の誘導に関する研究. *日口外誌* 34: 438-450 1988.
 - 38) 田上 正: 口腔癌患者における natural killer (NK) 活性に関する研究. *日口外誌* 29: 208-223 1983.
 - 39) Eremin, O., Coombs, R.R.A., et al.: Lymphocytes infiltrating human breast cancers lack K-cell activity and show low levels of NK-cell activity. *Br J Cancer* 44: 166-176 1981.
 - 40) 伊東恭悟, Balch, C.M., 他: 腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL, Tumor Infiltrating Lymphocytes) とリンホカイン活性化リンパ球 (LAK Cells, Lymphokine Activated Killer Cells)—ヒト新鮮分離癌細胞に対するキラー細胞とインターロイキン 2 による活性化—. *Oncologia* 20: 2071-2085 1987.
 - 41) Rabinowich, H., Cohen, R., et al.: Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors: lysis of autologous human tumor cells by cultured infiltrating lymphocytes. *Cancer Res* 47: 173-177 1987.
 - 42) Inoue, Y., Shijubo, N., et al.: Induction of killer cells from lymphocytes in pleural effusion of advanced lung cancer patients. *Jpn J Cancer Res* 81: 1012-1020 1990.
 - 43) Vose, B.M.: Quantitation of proliferative and cytotoxic precursor cells directed against human tumors: limiting dilution analysis in peripheral blood and tumor site. *Int J Cancer* 30: 135-142 1982.
 - 44) Keong, A. and Rabson, A.R.: Supernatants derived from a human hepatocellular carcinoma cell Line (PLC/PRF/5) activates a population of T-suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother* 15: 178-183 1983.
 - 45) 伊東恭悟: 転移性メラノーマ腫瘍内に浸潤するリンパ球. *癌と化学療法* 14: 2119-2126 1987.
 - 46) 高橋雄三, 森 良之, 他: 口腔扁平上皮癌に対する rIL2 の局所投与による臨床的ならびに免疫学的治療効果. *BIOThERAPY* 1: 99-106 1987.
 - 47) Pizza, G., Severini, G., et al.: Tumour regression after intralesional injection of interleukin 2 (IL-2) in bladder cancer. Preliminary report. *Int J Cancer* 34: 359-367 1984.
 - 48) Muul, L.M., Spiess, P.J., et al.: Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. *J Immunol* 138: 989-995 1987.
 - 49) 青木陽一, 田中憲一: 腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) を用いた養子免疫療法の現状と今後の展望. *BIOThERAPY* 4: 1600-1605 1990.
 - 50) Pisani, R.J., Leibson, P.J., et al.: *In vitro* activation of lymphocytes from nonsmall cell cancer patients by interleukin 2 and anti-CD3 antibody. *Clin Immunol Immunopathol* 50: 348-363 1989.
 - 51) 高橋雄三, 森 良之, 他: インターロイキン 2 活性化口腔癌患者末梢血リンパ球の自己新鮮腫瘍細胞に対する細胞障害活性. *日口外誌* 35: 341-360 1989.
 - 52) Lanier, L.L. and Phillips, J.H.: Evidence for three types of human cytotoxic lymphocytes. *Immunol Today* 7: 132-134 1986.
 - 53) Hersey, P. and Bolhuis, R.: Nonspecific MHC-unrestricted killer cells and their receptors. *Immunol Today* 8: 233-239 1987.
 - 54) 熊谷勝男, 藤井昌彦, 他: 腫瘍の増殖抑制に関与するキラーリンパ球—ヒトでの解析. *BIOThERAPY* 3: 620-628 1989.
 - 55) 森 良之, 高橋雄三, 他: 口腔扁平上皮癌患者リンパ球より誘導された抗 CD3 抗体/IL-2 活性化細胞 (CD3・LAK) の標的細胞認識の検索. *頭頸部腫瘍* 18: 投稿中.
 - 56) Okada, Y., Yahata, G., et al.: A correlation between the expression of CD8 antigen and specific cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes. *Jpn J Cancer Res* 80: 249-256 1989.
 - 57) 田中憲一: CTL の誘導における腫瘍細胞の HLA 抗原発現の意義. *BIOThERAPY* 3: 638-646 1989.
 - 58) Chakraborty, N.G., Sporn, J.R., et al.: Suppression of lymphokine-activated killer cell generation by tumor-infiltrating lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 59: 407-416 1991.
 - 59) 菅 典道, 三瀬圭一, 他: TIL と癌治療. *癌治療と宿主* 2: 29-36 1990.
 - 60) 堀 泰祐, 菅 典道, 他: ヒト固型癌および癌性胸腹水中の腫瘍浸潤リンパ球の抗腫瘍能とそれを用いた癌治療の試み. *日癌治* 20: 943-953

1985.

61) 野村直弘, 上出利光, 他: 接着分子. 第1版,
メジカルビュー社, 東京, 1991, 92-103頁.

62) Wong, R.A., Alexander, R.B., et al.: *In vivo*

proliferation of adoptively transferred tumor-
infiltrating lymphocytes in mice. *J Immunother* 10: 120-130 1991.