— 原 著 —

養子免疫療法の効果増強に関する実験的検討

LAK 細胞の誘導条件, 治療効果ならびに抗癌剤との併用について

吉森 浩三

日本医科大学内科学第4教室

A study to increase the therapeutic effects of adoptive immunotherapy in vivo
Influence on the generation of lymphokine activated killer (LAK) cells and
therapeutic effects of LAK cells with anti-tumor drug (cyclophosphamide)

Kozo Yoshimori

The Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

To enhance the effect of adoptive immunotherapy (AIT), we investigated the induction and characteristics of lymphokine activated killer (LAK) cells and also analyzed the combined effects of AIT with an antitumor drug (cyclophosphamide: CPA) in mice models. LAK cells were generated from C57/BL/6 (B6) spleen cells. The spleen cells were passed through a nylon wool column and cultured in RPMI-1640 medium containing 10%FCS and 2×10^3 units of human recombinant IL-2 (hr IL-2) for up to 14 days. During this period, the time kinetic analyses of the LAK cells' cytotoxicity and motility were performed. The cytotoxicities against Lewis Lung Carcinoma (3LL), evaluated by standard ^{51}Cr release assay, gradually increased during the cultured period, and the motilities, determined by a modified version of the Boyden chamber method, greatly increased within the first 7 days' incubation. Based on these in vitro findings, we examined the efficacy of AIT alone or in combination with chemotherapy (CPA) in in vivo studies. AIT was performed in the following way: LAK cells were intravenously infused and rIL-2 was intraperitoneally administered for 5 consecutive days following LAK cell administration. CPA was intraperitoneally administered. The therapy protocols were as follows. There were seven experimental groups. Group I; the mice were infused with 3-day cultured LAK cells (3DLAKs) on the second day after tumor inoculation (day 2). Group II; the mice were infused with 3DLAKs on day 5. Group III; 10-day cultured LAK cells (10DLAKs) on day 2. Group IV; 10DLAKs on day 5. Group V (AIT and CPA combination); AIT (10DLAKs) was started on day 5 followed by CPA on day 10. Group VI; CPA was performed on day 5 followed by AIT (10DLAKs) on day 10. Group VII; CPA was performed on day 5 without AIT. Each group consisted on 15 mice. The therapeutic efficacies were evaluated by calculating the median survival time of each group. The results of these experiments were as follows (mean $\pm$ SD); Group I's median survival time was 16.8 ± 3.2 days, Group II 15.1 ± 2.1 days, Group III 19.2 ± 5.4 days, Group IV 16.1 ± 4.8 days, Group V 23 ± 6.3 days, Group VI 32 ± 8.4 days and Group VII 22 ± 5.1 days. These results suggested that the efficacy of AIT is closely related to the LAK cells' cytotoxicity and motility. Although AIT alone in the advanced tumor bearing host had a limited effect, combination with CPA improved it's efficacy. Thus, chemoimmunotherapy leads to a significant survival advantage in vivo. Our findings may enhance the efficacy of adoptive immunotherapy.

Key words: adoptive chemoimmunotherapy, LAK cells motility, cyclophosphamide

緒 言

現在, 悪性腫瘍に対する免疫療法として各種 biolog-

ical response modifier (BRM) を用いた全身および局所療法が盛んに行われている。なかでも Rosenberg らによる, interleukin-2 (IL-2) をリンパ球に加えて誘導されてくる, natural killer (NK) 細胞抵抗性の腫瘍細胞にも殺細胞能を有する細胞, すなわち lymphokine activated killer (LAK) 細胞を投与する養子免

Correspondence to Kozo Yoshimori, The Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School Hospital, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

疫療法に注目が集められてきている¹⁻³⁾。しかし、臨床では LAK 細胞の単独投与は、副作用は少ないもののみるべき抗腫瘍効果は得られていない⁴⁾。実験的には担癌マウスに LAK 細胞を投与した際に、recombinant interleukin-2 (rIL-2) を投与すると、すでに投与された LAK 細胞を増加、活性化させ^{5,6)}、抗腫瘍効果を増強させることが報告されている⁷⁻¹²⁾。

以上のことから我々は、LAK+IL-2 療法のみならず、化学療法を併用することによってより高い抗腫瘍効果を得るための可能性を、マウスを用いて実験的に検討を行ったので報告する。

実験材料および方法

(1) 材料

1) 実験動物

C57 BL/6 (B6) マウス (チャールスリバー、東京) 7~8 Wk のものを用いた。

2) 腫瘍細胞

Lewis Lung Carinoma cell (3 LL) (大塚、癌研究所より分与) を、10% 非働化ウシ胎児血清 (10% heat-inactivated fetal calf serum: FCS) (Gibco, U.S.A.) を加えた RPMI-1640 (Gibco, U.S.A.), すなわち RPMI-FCS 培養液 (complete medium: CM, streptomycin 100 mg/ml, penicillin 100 U/ml を含む) の中で 3~5 日間継代培養したものを用いた。肺内転移を形成させるために、生食に 3 LL 細胞 $5 \times 10^5/0.1 \text{ ml}$ を浮遊させたものを B6 マウスの尾静脈より投与した。LAK 活性の測定では標的細胞として 3 LL 細胞を使用した。

(2) 実験方法

1) 細胞障害活性の測定

i) 脾細胞の分離

B6 マウスより脾臓を摘出し、細切後 60 号ステンレススチールメッシュ (250 μm) 上で圧挫ろ過して得られた細胞浮遊液を、RPMI-1640 Medium にて 2 回洗浄し、続いて hypotonic shock にて赤血球を除去した後 Nylon wool を通して得られた non-adherent cell を $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整して用いた。

ii) LAK 細胞の誘導

$1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した non-adherent splenocytes (分離方法は前記) を human recombinant interleukin-2 (hrIL-2) (S-6820, 塩野義より供与) $1.4 \times 10^3 \text{ JRU/ml}$ を加えた RPMI-FCS 培養液に浮遊させ、その 2 ml を培養プレート (24 well-multidish, Nunc,

Denmark) に移し、 37°C 5% CO_2 の条件下で 3, 5, 7, 10, 14 日間培養し LAK 細胞を誘導した。静注用には誘導された LAK 細胞を RPMI-1640 Medium にて 3 回洗浄し、生食に浮遊させたものを $5 \sim 8 \times 10^7/0.1 \text{ ml}$ に調節し用いた。

rIL-2 は 134 個のアミノ酸からなる分子量 15,000 の蛋白質で、National Cancer Institute, Bethesda, USA の Jurkat IL-2 標識¹³⁾に基づき算出した生物学的非活性は $1 \times 10^7/\text{mg protein}$ であった¹⁴⁾。

iii) 標的腫瘍細胞の標識

3 LL 細胞 $1 \times 10^7/\text{ml}$ を含む RPMI-FCS 培養液 0.25 ml に、125 μCi の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (日本アイソトープ協会) を含む RPMI-FCS 培養液 0.25 ml を加え、5% CO_2 , 37°C にて 1 時間培養することにより腫瘍細胞の標識を行った。培養後、Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) 20 ml で 2 回、さらに RPMI-FCS 培養液 20 ml で 1 回遠沈洗浄後、標識細胞を 40 ml の RPMI-FCS 培養液で $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した。この ^{51}Cr 標識細胞を標的細胞 (Target 細胞) として実験に使用した。

iv) 細胞障害性試験

Target 細胞として ^{51}Cr 標識 3 LL 細胞を RPMI-FCS 培養液で $1 \times 10^5/\text{ml}$ に調整し、また Effector 細胞として各濃度に調整した脾細胞リンパ球および LAK 細胞を RPMI-FCS 培養液に $0.5 \sim 2.0 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、細胞浮遊液 100 μl を作成した。Target 細胞、Effector 細胞浮遊液各 100 μl を加えて混合 (E/T ratio = 5~20:1) し、総量 200 μl として 96 well の V 底マイクロプレート (Cell-Cult, Sterilin Limited, England) で、5% CO_2 , 37°C にて 4 時間培養を行った。培養後マイクロプレートを 400 G, 10 分間の遠心を行い、上清 100 μl に含まれる放射活性をオートガンマカウンター (Auto well gamma system, ARC-305, Aloka, 東京) で測定した。Effector 細胞であるリンパ球を含まない標識細胞の上清細胞浮遊液 100 μl に RPMI-FCS 培養液 100 μl を加え、前述の条件下で培養後、400 G, 10 分間遠心し、上清に含まれる 100 μl 中の放射活性を測定し、これを標識腫瘍細胞からの ^{51}Cr の spontaneous release とした。

標識腫瘍細胞からの maximum release は、ドライアイス+アルコールによる凍結と熱湯による融解を 5 回繰り返して、標的細胞を破壊した後、400 G, 10 分間遠心し上清 100 μl に含まれる放射活性より求めた。

実験は triplicate culture で行い、細胞障害能

Fig. 1 A cartoon of blindwell chemotactic chambers.^{15,16)} Cell motility were assessed by using Blindwell chemotactic chambers (Labo Science). Upper chamber was filled with LAK cells suspension $200 \mu\text{l}$: $2 \times 10^5/\text{ml}$ (RPMI-1640+10%FCS) and the lower chamber was filled with complete medium alone. The chambers were separated by $8 \mu\text{m}$ pore size nitrocellulose filters. The chambers were incubated for 60 min at 37°C in 5% CO_2 in a moisturized incubator. After incubation, the filters were removed, fixed in 70%ethanol and then stained with hematoxylin and eosin.

(Cytotoxicity) は下記の計算式にて算定した。

Percentage of Cytotoxicity =

$$\frac{\text{Experimental cpm-spontaneous cpm}}{\text{Maximum cpm-spontaneous cpm}} \times 100 (\%)$$

2) 細胞運動能の測定^{15,16)}

Blindwell chemotaxis chamber (Labo, Science) (Fig. 1) を用いて, upper-chamber に RPMI-FCS 培養液で $2 \times 10^5/\text{ml}$ に調整した LAK 細胞浮遊液 $200 \mu\text{l}$ を置き, $8 \mu\text{m}$ pore size nitrocellulose 膜 (N-C 膜) (Sartorius) を隔て, lower-chamber は RPMI-FCS 培養液のみとした。5% CO_2 , 37°C 条件下で 1 時間培養後, N-C 膜を取り出し, 70%アルコールにて固定, N-C 膜内に遊走した LAK 細胞を Hematoxirin-Eosin 染色にて染め, 表面より $40 \mu\text{m}$ 以上移動した LAK 細胞を鏡検 (HPF 10×40), 1 視野における細胞数を算定し, 10 視野の細胞数の平均値を運動能として求めた。

3) Adoptive immunotherapy

B/6 マウスに生食で調整した 3 LL 細胞 $5 \times 10^5/0.1 \text{ ml}$ を尾静脈より移植し, その日を Day 0 とし, 肺転移を作成, 前述の 3 日間または, 10 日間培養の LAK 細胞を生食で $5 \times 10^7/0.1 \text{ ml}$ に調整し, それぞれ 3 LL 細胞接種後 Day 2 または Day 5 に, 肺転移を作成した B6 マウスの尾静脈より投与し, その後 5 日間 IL-2 $1.4 \times 10^4 \text{ JRU}/0.1 \text{ ml}$ を腹腔内投与した。

I. Control 群: 無治療。

II. Day 2 に 3 日間培養 LAK 細胞を投与。

III. Day 2 に 10 日間培養 LAK 細胞を投与。

IV. Day 5 に 3 日間培養 LAK 細胞を投与。

V. Day 5 に 10 日間培養 LAK 細胞を投与。

の各 5 群におけるその生存を観察した。

4) Adoptive immunochemotherapy

前述の adoptive immunotherapy 同様に生食に浮遊させた 3 LL 細胞 $5 \times 10^5/0.1 \text{ ml}$ を B6 マウスの尾静脈より投与し, その日を Day 0 とし,

I. Control 群: 無治療群。

II. LAK 群: 腫瘍接種後 Day 10 に 10 日間培養の LAK 細胞 $8 \times 10^7/0.1 \text{ ml}$ を尾静脈より投与その後 5 日間 IL-2 $1.4 \times 10^4 \text{ JRU}/0.1 \text{ ml}$ 腹腔内投与。

III. CPA 群: Day 5 に CPA 150 mg/kg 腹腔内投与。

IV. CPA+LAK 群: Day 5 に CPA 150 mg/kg 腹腔内投与, Day 10 に LAK 細胞を投与し, その後 5 日間 IL-2 $1.4 \times 10^4 \text{ JRU}/0.1 \text{ ml}$ 腹腔内投与。

各 4 群での生存を観察した。

5) LAK+IL-2 療法における抗癌剤

Cyclophosphamide (CPA) 投与の検討

I: CPA-LAK 群: B6 マウスに生食にて調整した 3 LL 細胞 $5 \times 10^5/0.1 \text{ ml}$ を尾静脈より投与し, Day 5 に Cyclophosphamide (CPA) 150 mg/kg (注射用蒸留水 10.0 ml に溶解して使用) を腹腔内投与し, さらに Day 10 に 10 日間培養の LAK 細胞 $8 \times 10^7/0.1 \text{ ml}$ を尾静脈より投与, その後 5 日間 IL-2 $1.4 \times 10^4 \text{ JRU}/0.2 \text{ ml}$ 腹腔内投与。

II: LAK-CPA 群: 3 LL 細胞投与後 5 日目に $8 \times 10^7/0.1 \text{ ml}$ LAK 細胞を尾静脈より静脈投与し, その後 5 日間 IL-2 $1.4 \times 10^4 \text{ JRU}/0.1 \text{ ml}$ 腹腔内投与し, 終了後 CPA 150 mg/kg 腹腔内投与。

上記 2 群での生存を観察した。

また, CPA-LAK 群, LAK-CPA 群で 3 LL 細胞投与後 Day 15 に B6 マウスより脾臓を取り出し細胞を分離し, この時点における細胞障害性および, 採取した細胞を IL-2 $1.4 \times 10^4 \text{ JRU}/\text{ml}$ とともに 4 日間培養し, ここで誘導される LAK 細胞の細胞障害性を 3 LL 細胞を target cell として ^{51}Cr release assay にて測定した。

6) LAK 細胞の腫瘍組織集積性の検討

IL-2 $1.4 \times 10^3 \text{ JRU}/\text{ml}$ とともに 7~10 日間培養し誘導した LAK 細胞を, RPMI-FCS 培養で $1 \sim 2 \times 10^8/0.5 \text{ ml}$ に調整し, $125 \mu\text{Ci Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を加え, 37°C , 5% CO_2 の条件下で 1 時間培養標識した。その ^{51}Cr 標識 LAK 細胞を, MEM 20 ml にて 2 回, RPMI-FCS 培

養液にて1回洗浄後、生食にて $2 \times 10^6/0.2 \text{ ml}$ に調整した。3 LL 細胞 $5 \times 10^5/0.1 \text{ ml}$ を右腹壁皮下に移植し、移植後5日目に腫瘤を形成した状態となったB6マウスに前述の標識LAK細胞を投与した。

CPA 群：3 LL 細胞投与日をDay 0とし、Day 5にCPA 150 mg/kgを腹腔内投与。

Control 群：無処理群。

CPA 群およびControl 群の両群にDay 10に ^{51}Cr にて標識したLAK細胞 $2 \times 10^6/0.1 \text{ ml}$ を尾静脈より投与し、LAK細胞投与後24時間後にそのマウスより肺、脾、肝、腫瘍を取り出しガンマカウンターにてその ^{51}Cr にて標識されたLAK細胞の集積性を計測した。

結 果

1. LAK細胞誘導に関する基礎的検討

細胞増殖率、細胞障害性、運動能に関してC57 BL/6マウスの脾臓より分離した細胞を、IL-2とともに培養し、3, 5, 7, 10, 14日毎にMedium交換を行いながら、細胞数、細胞障害性を測定した。細胞数は7日より急激に上昇し、培養14日目には 13.8 ± 4.3 倍となった (Table 1)。細胞障害性は3日目より上昇し3 LL細胞をtarget cellとした ^{51}Cr release assay (E/T ratio=20:1) にて $23.4 \pm 6.2\%$ となり、14日目には $37.6 \pm 10.6\%$ と、その障害性は徐々に上昇し維持された (Fig. 2)。30%total lytic unitsにて表現するとDay 0: <2.5, Day 3: <2.5, Day 7: $<5.5 \pm 1.8$, Day 11: 9.3 ± 3.1 , Day 14: 13.3 ± 4.2 (mean $\pm$ SD) となった。

Boyden chamber (Fig. 1)を用いて測定した運動能は3日目より急激に上昇し7日目には平衡状態に達し、14日目までその運動能は維持された (Fig. 3)。

Table 1 Increase of LAK cells proliferation during the culture

Days in culture							
Day	0	3	5	7	10	14	
Fold expansion	1.0	1.2 ± 0.4	1.3 ± 0.4	2.4 ± 0.7	5.6 ± 1.7	13.8 ± 4.3	

Spleen cells from C57 BL/6 mice were cultured with $2 \times 10^6 \text{ U/ml}$ of IL-2 at 37°C in a 5% CO_2 moisturized incubator in complete medium (CM), and the CM was exchanged at each counting point. Each data represents mean $\pm$ SD of five experiments. CM was consisted of RPMI-1640 medium with 10% FCS

培養開始後7日目以降に誘導されるLAK細胞は運動性、細胞障害性、細胞増殖能に関して短期間培養 (3~5日間培養) のLAK細胞と比較すると明らかに増加していた。

以上のことから細胞障害性の得られる3日間培養 (短期培養LAK細胞) と、運動能が平衡状態に達している10日間培養 (長期培養LAK細胞) のLAK細胞を用いて以下の実験に用いた。

Fig. 2 Time kinetics of LAK cells cytotoxicity.

LAK cells were generated with IL-2 ($1.4 \times 10^6 \text{ JRU/ml}$) in complete medium (CM). Cytotoxicity of LAK cells to 3 LL tumor cell as target were determined by standard ^{51}Cr release assay as described in "Materials and Methods". The lytic units (LU_{30}) on each days were calculated as follows; for <2.5 at Day 0, <2.5 at Day 3, 5.5 ± 1.8 at Day 7, 9.3 ± 3.1 at Day 11 and 13.3 ± 4.2 at Day 14 (mean $\pm$ S. D.). LU_{30} means the number of lytic units resulting in 30% specific ^{51}Cr release of 1×10^4 of 3 LL cells per 1×10^6 cells, Bars represent $\pm$ SD.

Fig. 3 Time kinetics of motility of LAK cells.

Random migration was assessed by using a chemotaxis chamber that was expressed as total cell numbers at ten times microscopic high power field (HPF 10×40) migrated into filters beyond the depth of $40 \mu\text{m}$ during 60 min. At day 0, cell motility expressed for 6.0 ± 3.1 , day 7 and day 14 expressed 103.7 ± 9.1 , 102 ± 14.7 . Each point means migration rate for 5 animals; Bars represent $\pm$ SD.

Fig. 4 The time schedule of experiments for immunotherapy.

At day 0, 3 LL tumor cells (5×10^5 /head) were inoculated through the tail veins of B 6 mice. LAK cells were generated in 1.4×10^4 JRU/ml rIL-2 contained complete medium at 37°C in 5% CO_2 moisturized incubator for 3 or 10 days cultured. Tumor bearing mice were infused with 5×10^7 /head of LAK cells (i.v.) and IL-2 1.4×10^4 /head (i.p.) for 5 consecutive days. I: control group, II: infused with 3 days cultured LAK at Day 2, III: infused with 10 days cultured LAK at Day 2, IV: infused with 3 days cultured LAK at Day 5, V: infused with 10 days cultured LAK at Day 5.
 $\downarrow$: 3 LL, $\downarrow$: LAK, $\uparrow$: IL-2

Fig. 5 The time schedule of experiments for chemoimmunotherapy.

LAK cells were generated with IL-2 as described in "Materials and Methods". At day 0, 3 LL tumor cells (5×10^5 /head) were inoculated through the tail veins of B/6 mice, I: control group, II: LAK group was infused 8×10^7 of LAK cells through the tail veins at day 10 without IL-2 1.4×10^4 /head (i.p.) for 5 consecutive days. III: CPA group were administrated with 150 mg/kg of cyclophosphamide (CPA) (i.p.), IV: CPA+LAK group was infused LAK cells with IL-2 and administrated with CPA. $\downarrow$: 3 LL, $\downarrow$: CPA, $\downarrow$: LAK, $\uparrow$: IL-2

2. Adoptive immunotherapy (Fig. 4)

3 LL 細胞移植後 Day 2 に LAK 細胞を投与したものでは、10 日間培養の LAK 投与群 (III 群: 平均生存日数 20 日) は 3 日間培養の LAK 投与群 (II 群: 平均生存日数 17 日) に比して延命効果が得られた ($p < 0.05$). しかし、3 LL 細胞移植後 Day 5 に LAK 細胞を投与したものでは (IV 群, V 群) 3 日間培養の LAK 細胞および 10 日間培養の LAK 細胞を用いても両群とも延命効果が得られなかった (Table 2). 腫瘍移植後 Day 5 にこの投与量の LAK+IL-2 療法では十分な効果が得られず、より高い細胞障害性を確保するため LAK 細胞数を増量し 10 日間培養の LAK 細胞を用いて次の実験を行った。

3. Adoptive chemo-immunotherapy (Fig. 5)

Median survival time (MST) 平均生存日数は Control 群 15 日, LAK 群 18 日, CPA 群 22 日, CPA+LAK 群 32 日となり, CPA+LAK 群は LAK 群と比較して有意 ($p < 0.05$) な延命効果が認められた (Fig. 6).

Table 2 Median survival times (MST) of 3 LL tumor bearing mice treated with CPA and AIT

Group	I	II	III	IV	V
Median survival date (day)	14	17	20*	15	15 n=5
mean±SD (day)	14.8±3.2	16.8±3.2	19.2±5.4	15.1±2.1	16.1±4.8

Immunotherapy experiments were shown for the time schedule as follows; at day 0, 3 LL tumor cells (5×10^6 /head) were inoculated through the tail veins of B6 mice. LAK cells were generated with 1.4×10^4 JRU/ml of IL-2 containing complete medium at 37°C in 5% CO₂, and cultured for 3 to 10 days. Tumor bearing mice were translated with 5×10^7 /head of LAK cells (i.v.) and administered 1.4×10^4 JRU/head of IL-2 (i.p.) for 5 consecutive days from day 2 or 5 after tumor inoculation. I : control group, II: inoculated 3 days cultured LAK cells at Day 2, III: inoculated 10 days cultured LAK cells at Day 2, IV: inoculated 3 days cultured LAK cells at Day 5, V: inoculated 10 days cultured LAK cells at Day 5. Each data represents median data and mean±SD of five experiments.

*Significantly difference from control group ($p < 0.05$)

Fig. 6 The survival curves of tumor bearing mice treated with chemoimmunotherapy.

The AIT group was infused LAK cells (8×10^7) through the tail veins at day 10 with IL-2 1.4×10^4 JRU/head (i.p.) for 5 consecutive days. CPA group was administered with 150 mg/kg of CPA (i.p.) alone. CPA+LAK group was combined with CPA, LAK cells IL-2 therapy. Mean survival time (MST) of each group consisted of 15 mice was as follows. I: control group was 15 ± 2.5 days, II: LAK group 18 ± 3.4 days, III: CPA group 22 ± 5.1 days, IV: CPA+AIT group 32 ± 3.2 days (I, IV $p < 0.05$). AIT method was described in "Materials and Methods". These data suggested that chemoimmunotherapy prolonged the survival of mice inoculated 3 LL tumor cells (5×10^6) through the tail vein.

4. 担癌マウスにおける cyclophosphamide (CPA)

投与による腫瘍への LAK 細胞集積性の検討

3 LL 細胞を移植した B6 マウスで、CPA 投与による ^{51}Cr 標識 LAK 細胞の腫瘍への集積性の影響を観察した。肺、肝、脾臓では、その集積性は CPA 投与によ

る影響はなく、移植腫瘍において CPA 投与により 1.7 倍の ^{51}Cr 標識 LAK 細胞の集積性の上昇を認めた (Table 3)。

Table 3 Accumulation of ^{51}Cr labelled LAK cells to various sites in 3 LL tumor bearing mice treated with CPA

	Radioactivity recovered (cpm/g)				Accumulation ratio in tumor
	Tumor	Lung	Spleen	Liver	
Expl. 1 Control	428.8 ± 87.4	11,764.7 $\pm 4,231.8$	27,692.3 $\pm 5,267.4$	17,364.5 $\pm 3,274.8$	1.86
CPA treated	797.6 ± 121.3	13,785.2 $\pm 3,278.4$	25,789.2 $\pm 6,348.5$	19,278.5 $\pm 3,964.3$	n=5
Exp. 2 Control	268.4 ± 82.4	764.9 ± 182.7	15,238.3 $\pm 2,351.6$	12,354.9 $\pm 1,836.4$	1.60
CPA treated	428.0 ± 101.3	678.4 ± 274.6	14,382.5 $\pm 3,352.4$	11,258.9 $\pm 1,964.0$	n=5

The distributions of LAK cells in tumor bearing mice were assessed by counting the radioactivities of each site after ^{51}Cr labeled LAK cells (i.v.) inoculation. LAK cells (2×10^6) were suspended in 2 ml of RPMI-FCS medium, were incubated with 125 μCi $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ for 1 hr at 37°C. ^{51}Cr labelled LAK cells (2×10^6) were intravenously inoculated. 24 hours after injection, the mice were sacrificed. Tumors, lungs, spleens and livers were removed for γ -scintillation counting. CPMs (Mean $\pm$ SD) of tissues from 5 mice treated with or without CPA. These experiments have revealed that CPA pre-administration enhanced the LAK cells accumulation in tumor tissues

Table 4 Cytotoxicities of spleen cells from tumor bearing mice treated with chemotherapy and immunotherapy

Fresh spleen cells ^a	Cytotoxicities of spleen cells		
	After 4 days culture(LU ₁₀) ^a	Total LU ₁₀ (1×10^6)	Median survival time(day)
I 6.3 $\pm$ 0.4*	33.1 $\pm$ 2.8(10.1 $\pm$ 2.6)	18.2 $\pm$ 4.8*	32.0 $\pm$ 8.4*
II 3.2 $\pm$ 0.2	29.4 $\pm$ 3.1(4.2 $\pm$ 1.2)	4.9 $\pm$ 1.8	23.1 $\pm$ 6.3

a : % cytotoxicity * : $p < 0.05$ n=15

The schedules of AITs and CPA administrations were as follows. : Mice were inoculated 3 LL tumor cells ($5 \times 10^5/0.1$ ml) through the tail veins at day 0. Group I : CPA (150 mg/kg) was administered at Day 5 followed by AIT from Day 10. Group II : AIT started from Day 5 followed by CPA administration at Day 10. In both groups, spleens were removed at Day 15. The cytotoxicities of fresh spleen cells and LAK cells generated by 4 day incubation were evaluated by ^{51}Cr release assay (Target : 3 LL). E/T ratios were 50 : 1 for fresh spleen cells and 20 : 1 for 4 day cultured LAK cells. Each data represent mean $\pm$ SD of 15 experiments. LU₁₀ means the number of lytic units resulting in 10% ^{51}Cr release per 1×10^6 cells. AIT method was described "Materials and Methods".
Total LU₁₀ : (LU₁₀) $\times$ C cell number of cultured LAK cells)

5. LAK+IL-2療法とcyclophosphamide(CPA)併用による治療効果増強の検討

3 LL細胞 $5 \times 10^5/0.1$ mlを前述の Adoptive immunotherapyと同様に静脈内投与した日をDay 0とし、LAK+IL-2療法に時期を変えてCPAを併用投与し生存および細胞障害性に及ぼす効果を検討した(Table 4)。CPAをLAK+IL-2療法の前に投与するCPA+LAK群(平均生存日数 32 ± 8.4)では、LAK+IL-2療法後にCPAを投与するLAK+CPA群(平均

生存日数 23 ± 6.3) (方法を参照)に比べ有意に延命効果を認めた ($p < 0.05$)。

腫瘍移植後Day 15に両群(CPA+LAK群, LAK+CPA群)より脾臓を摘出, 単核球を分離し, その時点における細胞障害性を測定した。CPA+LAK群ではLAK+CPA群に比して高い細胞障害性を示していた($p < 0.05$)。しかし, その分離した細胞にIL-2を加え4日間培養し, 細胞障害性を観察すると, 両者での細胞障害性の差はなかったが, Total lytic unitで見ると

CPA+LAK 群は LAK+CPA 群に比して高値であった ($p<0.05$).

考 察

マウスリンパ球を IL-2 存在下で短期間培養すると NK 感受性, NK 抵抗性を問わず種々の癌細胞に対して障害性を有する Lymphokine activated killer (LAK) 細胞が誘導されることが, 1980 年 Yron¹⁷⁾によって初めて記載された. Grimm らは, 高い細胞障害性を示す LAK 細胞を得るためには少なくとも 48 時間, IL-2 と培養する必要があると報告している¹⁸⁾. 今回の結果では, マウスリンパ球に IL-2 を加えて 3 日間培養することで細胞障害性は得られるものの (Fig. 2), 運動能は低く, 7 日間以上培養することによって, 高い運動能を得ることが示された (Fig. 3). 担癌宿主に LAK 細胞を投与する場合, より高い抗腫瘍効果, あるいは標的癌細胞に到達する LAK 細胞数を増加させるには, 運動能の高い培養 7 日目以後の LAK 細胞を用いることが効果的と考えられる.

In vitro で, IL-2 により誘導した LAK 細胞は, 担癌宿主に単独移入するよりも IL-2 投与を併用することによって, 抗腫瘍効果の増強がみられ⁷⁻¹⁰⁾, このことは移入されたリンパ球が引き続き投与された IL-2 によって, 生体内でより長く活性を維持しているためと推定されている¹⁹⁾. また, マウスの肺, 肝臓の転移腫瘍に関しても LAK+IL-2 療法による, 効果が報告されている⁷⁻¹²⁾. マウスに経静脈的に投与した LAK 細胞は, 肺, 肝, 脾, リンパ節などに分布し, LAK 細胞投与後さらに IL-2 を投与することにより LAK 細胞の細胞障害性が増強されることが示されている^{20,21)}.

我々の実験で, 腫瘍接種後 2 日目, 5 日目に LAK+IL-2 療法を施行すると, 接種後 2 日目に治療を開始した場合, 生存の延長が認められた. しかし, 転移の形成された腫瘍移植後 5 日目のマウスに LAK+IL-2 療法を開始しても延命効果を得るにはいたらず, 早期 (腫瘍移植後) に LAK+IL-2 療法を開始することによって micrometastasis の抑制が得られたためと考えられる¹⁸⁾. また, 10 日間培養の LAK 細胞を用いることでより延命効果が得られたのは, LAK 細胞の運動能が影響しているものと思われた (Table 2).

担癌宿主には腫瘍に対する免疫反応を抑制する suppressor T cell が存在し, その存在が腫瘍増殖を促進させ, 細胞障害性を抑制している場合がある²²⁾. 養子免疫療法は有効な治療法の一つではあるが個体の免疫

能が著しく低下している場合, あるいは腫瘍負荷が大きすぎる場合には効果が十分に発揮されない. 移植癌を用いた担癌宿主においては, suppressor T cell が誘導され, 移入した LAK 細胞の能力を半減させていることも考えられる. Lewis lung carcinoma, SV-40 transformed cell, Mastocytoma, mammary carcinomas, MCA-induced fibrosarcoma, Plasmacytoma, Meth A, などの腫瘍細胞を用いた実験で suppressor T cell の作用が報告されている²⁴⁾. Suppressor T cell の腫瘍増殖促進効果は, 腫瘍系により異なり, またその存在の有無により腫瘍の増殖, 退縮が左右される報告もあるが²³⁾, 一般的には suppressor T cell は腫瘍増殖の促進, 移植後の腫瘍出現時間の短縮, 転移数の増加など, 拒絶反応の遅延に作用すると報告されている²⁵⁾.

Cyclophosphamide (CPA) などのアルキル化剤は, suppressor T 細胞出現の抑制 (産生までの段階を阻止する) を介して, 腫瘍増殖を抑制する効果を持つとされ^{26,27)}, CPA 単独投与でもその suppressor T 細胞の活性は阻害される²⁸⁾. 細川ら²⁹⁾は, IL-2 と CPA の併用によって治療効果が増強することを報告している. また³¹Cr で標識したリンパ球を, 静脈内に投与しても腫瘍内への集積はほとんど認められない^{30,31)}. 今回の実験結果でも担癌宿主に投与した LAK 細胞は腫瘍内にはわずかに集積しているのみであった. しかし, 予め CPA を担癌宿主に投与しておくと, その後に移入された LAK 細胞の腫瘍への集積性は増強される傾向が示された (Table 3).

今回の実験で, 3 LL 腫瘍細胞を移植したマウスに, CPA を投与し次いで LAK+IL-2 療法を施行することにより生存の延長 (Table 4) が認められたのは, CPA の抗腫瘍効果に加えて先に投与された CPA によって宿主の suppressor T cell の活性が減弱化し, さらに IL-2 投与によって活性化された LAK 細胞の癌組織局所への集積性が高められ, 抗腫瘍効果の増強がもたらされたためと推察された.

結 論

リンパ球を IL-2 とともに 72 時間培養することで抗腫瘍効果を示す LAK 細胞が誘導されるが, 運動能に関しては, 7 日間培養以後に最大となり, 得られる細胞数, 抗腫瘍活性, 運動能の面から, 長期培養 (検討した期間内では 10~14 日間培養) の LAK 細胞が抗腫瘍効果に関して優れていることが明らかにされた.

また、腫瘍移植 5 日目に LAK 細胞を投与しても効果はなく、移植 2 日目に LAK 細胞を投与することで有効な抗腫瘍効果が得られた。

化学療法として Cyclophosphamide を LAK 細胞の移入に先行して投与することにより、腫瘍細胞に対する直接細胞障害効果のほか、suppressor T cell に対する抑制効果に加えて、さらに IL-2 によって活性化された LAK 細胞の癌組織への集積性の増強効果が、in vivo における生存を延長させたものと考えられた。

今後臨床において、Cyclophosphamide のような suppressor T cell を抑制する抗癌剤と養子免疫療法の適切な併用により、優れた抗腫瘍効果の得られることが期待される。すなわち、癌を摘出した術後症例、あるいは化学療法、放射線療法によって腫瘍が消失または著明に縮小した症例に、化学療法と養子免疫療法を併用することによって予後の改善、生存期間の延長をもたらす得る効果的な集学的治療法として、有力な癌治療法の一つになり得るものと思われる。

稿を終えるにあたり有意義な御助言、御協力を頂きました日本医科大学内科学第 4 教室仁井谷久暢教授および倉根修二博士をはじめとする教職員各位に深く感謝いたします。なお、本論文の一部は第 30 回日本肺癌学会総会（平成元年 11 月）、第 28 回日本癌治療学会総会（平成 2 年 10 月）において報告した。

文 献

- 1) Mazumder, A. and Rosenberg, S.A.: Successful immunotherapy of natural killer resistant established pulmonary melanoma metastasis by the intravenous adoptive transfer of syngeneic lymphocytes activated in vitro by interleukin-2. *J. Exp. Med.*, 159, 495~507, 1985.
- 2) Rosenstein, M., Yrin, I., Kaufmann, Y. and Rosenberg, S. A.: Lymphokine-activated killer cells; Lysis of fresh syngeneic natural killer resistant murine tumor cells by lymphocytes culture in interleukin-2. *Cancer Res.*, 44, 1946~1953, 1984.
- 3) Grimm, E.A., Mazumder, A., Zang, 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 lymphocyte. *J. Exp. Med.*, 155, 1823~1841, 1982.
- 4) Rosenberg, S.A.: Immunotherapy of cancer by systemic administration of lymphoid cells plus interleukin-2. *J. Biol. Response Modif.*, 3, 501~511, 1984.
- 5) Donohue, J.H., Rosenstein, M., Chang, A.F., Loze, M.T. and Rosenberg, S.A.: The systemic ability of sensitized murine lymphocyte lines to culture a disseminated syngeneic lymphoma. *J. Immunol.* 132, 2123, 1984.
- 6) Hefeneider, S.H., Colon, P.J., Henney, C.S. and Gillis, S.: In vivo interleukin 2 administrate augment the generation of allo reactive cytotoxic T cell lymphocytes and resistant natural killer cells. *J. Immunol.*, 130, 222, 1983.
- 7) Mnlc, J.J., Shu, S., Schwarz, S.L. and Rosenberg, S.A.: Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases from LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science (Wash, D.C.)*, 225, 1487~1489, 1984.
- 8) 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.
- 9) Mule, J.J., Shu, S. and Rosenberg, S.A.: The anti-tumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 in vivo. *J. Immunol.*, 135, 645~652, 1985.
- 10) Papa, M.Z., Mule, J.J., Rosenberg, S.A.: Antitumor efficacy of lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin 2 in vivo; Successful immunotherapy of established pulmonary metastases from weakly immunogenic of nonimmunogenic murine tumor of three distinct histological types. *Cancer Res.*, 46, 4973~4978, 1986.
- 11) Ettinghausen, S.E. and Rosenberg, S.A.: Immunotherapy of murine sarcoma using lymphokine activated killer cells; Optimization of the schedule and route of administration of recombinant interleukin-2. *Cancer Res.*, 46, 2784~2792, 1986.
- 12) Mule, J.J., Ettinghausen, S.E., Spiess, P.J., Shu, S. and Rosenberg, S.A.: Antitumor efficacy of lymphokine activated killer cells and recombinant and interleukin-2 in vivo; Survival benefit and mechanism of tumor escape in mice undergoing immuno therapy. *Cancer Res.*, 46, 676~683, 1986.
- 13) Gillis, S., Ferm, M.M., Ou, W. and Smith, K.A.: T cell growth factor; Parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.*, 120, 2027~2032, 1978.
- 14) Liang, S., Allet, B., Rose, K., Hirshi, M., Liang, C. and Thatcher, D.R.: Characterization of human interleukin 2 derived from *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, 229, 429~439, 1985.
- 15) Boyden, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.*, 21, 453~466, 1961.
- 16) Michna, H.: Induced locomotion of human and murine macrophages; A comparative analysis by mean of the modified Boyden-chamber system and the agarose migration assay. *Cell Tissue Res.*, 255, 423~429, 1989.
- 17) Yron, I., Wood, T.A., Spiess, P. and Rosenberg, S.A.: In vitro growth of murine T cells; The isolation and growth of lymphoid cells infiltrating syngeneic solid tumors. *J. Immunol.*, 125, 238~245, 1980.
- 18) Grimm, E.A.: IL-2 activated cytotoxic lymphocytes (LAK cells) as antigen non-specific amplifiers of the immune response; General characteristics and considerations for cancer therapy. In E. Podack (ed.), *Complement and Cytolytic as Effectors of the Immune System*, Cleveland OH. p. 1~34, CRC Press, 1986.
- 19) Cheever, M.A., Greenberg, P.D., Irele, C., Thompson, J.A., Henney, C.S. and Grillis, S.: Interleukin-2 administered in vivo induces the growth of cultured T cell in vivo. *J. Immunol.*, 132, 2259, 1984.

- 20) Ettinghausen, S.E., Lipford, E.H., III, Mule, J.J. and Rosenberg, S.A.: Recombinant interleukin 2 stimulates in vivo proliferation of adoptively transferred lymphokine-activated killer (LAK) cells. *J. Immunol.*, 135, 3623~3625, 1985.
- 21) Ettinghausen, S.E., Lipford, E.H., III, Mule, J.J. and Rosenberg, S.A.: Systemic administration of recombinant interleukin 2 stimulates in vivo lymphoid cell proliferation in tissues. *J. Immunol.*, 135, 1488~1497, 1985.
- 22) Lee, K.-E., O'Donnell, W. and Cockett, A.T.K.: Ineffectiveness of adoptive chemotherapy with lymphokine-activated killer cells, interleukin-2, and cyclophosphamide on palpable intradermal murine bladder cancer. *J. Bio. Res. Mod.*, 7, 43~53, 1988.
- 23) 藤本重義: 担癌生体における抑制性 T 細胞. 代謝, 16, 1853~1861, 1979.
- 24) Bankhust, A.D.: Suppressor cells in human disease. p. 315~357, Marcel Dekker Press, 1981.
- 25) Berendt, M.T. and North, R.J.: T-cell mediated suppression of antitumor immunity. *J. Exp. Med.*, 151, 69~86, 1980.
- 26) Nakajima, H., Abe, S., Masuko, Y., Tsubouchi, J., Yamazaki, M. and Mizuno, D.: Elimination of tumor-enhancing cells by cyclophosphamide and its relevance to cyclophosphamide, therapy of a murine mammary tumor. *Gann*, 72, 723~731, 1981.
- 27) Mizushima, Y., Send, F., Takeichi, N., Hosokuwa, M. and Kobayashi, H.: Enhancement of antitumor transplantation resistance in rats by appropriately timed administration of busulfan. *Cancer Res.*, 41, 2917~2921, 1981.
- 28) North, R.J.: Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *J. Exp. Med.*, 55, 1063~1074, 1982.
- 29) Hosokawa, M., Sawamura, Y., Morikage, T., Okada, F., Xu, Z.-Y., Morikawa, K., Itou, K. and Kobayashi, H.: Improved therapeutic effects of interleukin-2 after the accumulation of lymphokine-activated killer cells in tumor tissue of mice previously treated with cyclophosphamide. *Can. Imm. Immunoth.*, 26, 250~256, 1988.
- 30) Zatz, M.M. and Lance, E.M.: The distribution of ⁵¹Cr-labelled lymphocytes into antigen-stimulated mice. *J. Exp. Med.*, 134, 224~241, 1971.
- 31) Yamasaki, N., Kan, N., Inamoto, T., Nakayama, N., Nio, Y. and Hori, T.: In vivo kinetics of murine lymphoid cells; In relation to local cancer immunotherapy. *Arch. Jpn. Chir.*, 53, 67~78, 1984.

(受付: 1992年 7 月10日)