肝細胞癌患者における Lymphokine Activated Killer 細胞活性 (LAK 活性) 低下機序の検討

— LAK 活性誘導における γ -Interferon (γ -IFN) の関与について—

松 浦 靖・西原 利治・大西 三朗・山本 泰猛

Jpn. J. Clin. Immun., 11(3): 253~262, 1988.

**Studies on the mechanisms of decreased Lymphokine Activated Killer cell
activity (LAK activity) in patients with hepatocellular carcinoma (HCC)**

— with special reference to the involvement of γ -Interferon
production in LAK activity induction —

Yasushi Matsuura, Toshiji Saibara, Saburo Onishi and Yasutake Yamamoto

The First Department of Internal Medicine, Kochi Medical School

【Summary】

In order to study the mechanisms involved in the decreased LAK activity in HCC patients, factors involved in LAK activity induction were investigated on peripheral blood mononuclear cells (PMNC) of HCC patients with normal and low LAK activity and healthy volunteers.

1) In the experiments using PMNC of healthy volunteers and HCC patients with normal LAK activity, the addition of anti- γ -interferon (γ -IFN) to the LAK induction system at the start of incubation resulted in the suppression of LAK activity. In HCC patients with low LAK activity, γ -IFN production in LAK activity induction was significantly lower than that in healthy volunteers, HCC patients with normal LAK activity and liver cirrhosis patients. The addition of recombinant γ -IFN (r- γ -IFN) to the LAK induction system in HCC patients with low LAK activity enhanced the decrease in LAK activity.

From these results, it was suggested that γ -IFN played an important role in the induction of LAK activity.

2) PMNC subpopulations of HCC patients with low LAK activity were not significantly different from those of healthy volunteers. In healthy volunteers and HCC patients with normal LAK activity, LAK activities and γ -IFN concentrations in culture supernatants were decreased by the deletion of the Leu 7 positive or the Leu 11 positive cell populations, however the level of decreased LAK activities were still higher than that of HCC patients with low LAK activity. These were not enhanced significantly by the addition of r- γ -IFN.

In conclusion, it was suggested that the decrease in LAK activity in HCC patients was due to not only the impaired γ -IFN production but also the abnormalities of various LAK precursor cells.

Key words: lymphokine activated killer cell activity,
hepatocellular carcinoma,
interleukin-2,
 γ -interferon,
LAK precursor cell

【概 要】

肝細胞癌患者 (HCC) の lymphokine activated killer 細胞活性 (LAK 活性) 正常群, LAK 活性低値群, および健常者を対象に末梢血単核球から誘導される LAK 活性の発現に関与する因子を検討し, HCC における LAK 活性低下の機序を検討した. 1) 健常者および HCC の LAK 活性の誘導は抗 gamma interferon (γ -IFN) 抗体添加により抑制された. HCC の LAK 活性誘導時の γ -IFN 産生能は低下しており, γ -IFN 添加により LAK 活性の増強を認めた. したがって, LAK 活性誘導に γ -IFN の関与が示唆された. 2) HCC 末梢血単核球亜分画は健常者と比べ有意の変動を示さなかった. 健常者, および LAK 活性正常 HCC 群において, Leu 7 あるいは Leu 11b 分画除去により LAK 活性および培養上清中 γ -IFN 濃度は低下するが, LAK 活性低値 HCC 群に比し LAK 活性は依然高い活性を示した. また, その分画除去により低下した LAK 活性は γ -IFN 添加により有意の増強が認められなかった. 以上の成績より, HCC の LAK 活性低下は γ -IFN 産生障害のみでなく, LAK 前駆細胞としての広範な単核球系の異常の関与が推察された.

I. 緒 言

Lymphokine activated killer (LAK) 細胞は, cytotoxic T lymphocyte (CTL) と異なり特定の抗原刺激を必要とせず, 単核球を高濃度の interleukin 2 (IL-2) とともに培養することにより容易に誘導される. しかも, natural killer (NK) 細胞に比しより広域の抗腫瘍活性スペクトラムをもつ細胞集団として注目を浴びている^{1,2)}. しかし, 担癌生体では種々の免疫監視機構の傷害が報告されており^{3,4)}, われわれも肝細胞癌患者 (HCC) の LAK 活性が, 健常者, 肝硬変症患者に比し低下していることを報告してきた⁵⁾.

しかし, HCC の LAK 活性を詳細に検討したところ, HCC においても LAK 活性が健常者と同等に誘導される症例が存在し, LAK 活性正常 HCC 群, LAK 活性低値 HCC 群の両者が存在することが明らかとなった⁶⁾. 今回は LAK 活性正常 HCC 群, 健常者の LAK 活性発現に影響を及ぼす因子について検討し, LAK 活性低値 HCC 群の LAK 活性低下の機序について, 主として γ -interferon (γ -IFN) の面より検討したので報告する.

II. 対象および方法

1. 対 象

表 1 に示すごとく, LAK 活性低値の肝硬変を伴う肝細胞癌患者 (HCC) 13 例 (うち 3 例は HBs 抗原陽性), LAK 活性正常の肝硬変を伴う HCC 6 例 (うち 3 例は HBs 抗原陽性), 肝硬変症患者 (LC) 11 例 (うち 3 例は HBs 抗原陽性), HBs 抗原陰性で肝機能正常の健常者 23 例を対象とした.

2. 方 法

1) 末梢血単核球の採取

ヘパリン加末梢血より Ficoll-Conray 比重遠心法により単核球を採取した. 生存率は trypan blue dye exclusion 法にて 97% 以上を示した.

2) Recombinant Interleukin 2 (rIL-2)

本実験に供した rIL-2 (武田薬品工業株式会社より供与)⁷⁾ の生物学的比活性は, 米国国立がんセンター BRM プログラムによって提供された精製天然 IL-2 仮標準品との比較により 1.2×10^7 U/mg 蛋白であった.

表 1 Profiles of patients with hepatocellular carcinoma

Case	Sex	Age	HBsAg (RIA)	T-Bil (mg/dl)	GPT (IU/l)	ALP (IU/l)	ChE (IU/dl)	PT (sec*)	ICG(R15) (%)	AFP (ng/ml)	Tumor size
1	M	77	(-)	1.1	83	540	207	0.2	28.2	2,089	massive
2	F	73	(-)	1.5	25	183	67	0.8	46.5	2,623	nodular
3	M	61	(-)	0.6	43	132	132	0.7	31.6	4,523	massive
4	M	60	(-)	0.9	62	281	165	1.2	n.d.	412	nodular
5	M	56	(+)	1.3	57	302	163	1.0	38.9	286	massive
6	M	64	(-)	1.5	102	170	116	0.3	36.8	170	nodular
7	M	70	(-)	0.8	53	200	125	0	22.1	9,751	nodular**
8	M	61	(-)	0.7	106	206	287	0.1	n.d.	16	nodular
9	M	70	(-)	0.8	48	176	304	0.8	17.0	12	nodular
10	M	67	(-)	1.4	70	179	42	0.3	49.0	21,438	nodular**
11	M	66	(-)	1.8	172	455	269	0.8	33.7	1,120	massive
12	F	73	(+)	1.1	57	235	245	0.6	21.2	167,760	massive
13	M	49	(+)	0.6	182	158	255	0.7	7.4	778	nodular
14	M	64	(+)	0.6	81	201	228	0.5	43.3	219	nodular
15	M	65	(-)	15.0	408	250	81	1.6	50.7	2,222	nodular
16	F	62	(+)	2.3	38	140	81	3.3	67.1	48	nodular
17	M	60	(+)	1.5	59	330	n.d.	7.8	n.d.	3,499	massive
18	M	71	(-)	0.4	39	1,189	319	0	22.0	290	massive
19	F	77	(-)	1.9	50	355	n.d.	n.d.	n.d.	73	nodular

*: seconds above control

**: pulmonary metastasis

n.d.: not done

3) LAK 活性の測定

既報⁵⁾のごとく、上述した対象の末梢血単核球を rIL-2, 30 ng/ml の存在下に 2×10^6 /ml の濃度で 10% fetal calf serum 添加 RPMI 1640 培養液 (RPMI 培養液) 中で 37°C, 5%CO₂ 下に 72 時間培養し、洗浄後、効果細胞とした。標的細胞としては NK 細胞非感受性の HeLa 細胞 5×10^6 を RPMI 培養液 1 ml に浮遊させ、⁵¹Cr 200 μ Ci (New Engl Nucl) を添加、37°C, 5%CO₂ 下に 75 分間培養標識した。標的細胞 0.5×10^4 と末梢血単核球 1×10^5 (E:T ratio; 20:1) とを RPMI 培養液 0.2 ml 中に浮遊し、37°C, 5%CO₂ 下に 4 時間培養し上清中に放出された ⁵¹Cr から % cytotoxicity を次式により算出した。

$$\% \text{ cytotoxicity} = (A - C/B - C) \times 100$$

A: 実験時に培養上清中に放出される ⁵¹Cr 値B: 標的細胞を完全に破壊した時に上清中に放出される ⁵¹Cr 値C: 効果細胞非添加時に培養上清中に放出される ⁵¹Cr 値

4) Tac 抗体の調整

抗 IL-2 レセプター抗体含有腹水 (Tac 抗体, 京都大学第 1 内科内山卓博士より供与⁶⁾) を Hanks 培養液で 5 倍希釈した後、RPMI 1640 培養液で透析した。

5) Tac 抗体による LAK 活性誘導の阻害

健常者末梢血単核球を用いた上述の LAK 活性誘導系へ、培養開始時に上記のように調整した Tac 抗体を 4%, 8%, 16% v/v 濃度に添加し、LAK 活性誘導に対する阻害効果を検討するとともに、上清中に分泌される γ -IFN 濃度を後述の方法で測定した。また、Tac 抗体による阻害効果の特異性は 3 種類の異なる単クローン性抗体含有腹水を用いて同様の実験を行い対照実験とした。

6) 抗 γ -IFN 抗体による LAK 活性誘導の阻害

健常者末梢血単核球を用いた上述の LAK 活性誘導系へ、培養開始時に単クローン性抗 γ -IFN 抗体 (Cento-cor) をそれぞれ 40%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625% v/v 濃度に添加し、LAK 活性誘導に対する阻害効果を検討した。また、精製 IgG 単クローン性抗体を用いて同様の実験を行い対照実験とした。なお、1 ml の抗 γ -IFN 抗体は 8,000 U 以上の γ -IFN を完全に中和した。

7) LAK 活性誘導時の培養上清中における γ -IFN 濃度の測定

健常者および LC, LAK 活性正常 HCC 群, LAK 活性低値 HCC 群において、前述の方法に基づき末梢血単核球 2×10^6 /ml に対し rIL-2, 30 ng/ml 添加し、37°C 5%CO₂ 下、72 時間培養により LAK 活性を誘導した際、培養上清中に検出される γ -IFN 濃度を測定した。さら

表 2 Enhancement of LAK activity by the addition of recombinant γ -IFN

Healthy volunteer							Hepatocellular carcinoma						
		r- γ IFN (U/ml)							r- γ IFN (U/ml)				
		0	10	20	40	80			0	10	20	40	80
LAK activity (%)	1	10.6	15.1	21.3	14.7	18.0	LAK activity (%)	Case 1	4.9	12.5	30.5	30.5	36.6
	2	16.9	26.2	31.4	24.9	32.8		Case 2	16.0	22.5	22.2	24.0	47.5
	3	45.0	66.8	60.6	54.6	62.8		Case 3	2.3	12.1	11.2	25.2	29.0
	4	11.9	13.1	14.3	22.2	24.1		Case 4	6.8	10.9	14.9	21.2	25.7
	5	11.4	32.7	28.2	23.8	25.2		Case 5	2.8	8.8	20.6	12.9	12.8
	6	60.5	75.7	61.9	68.7	68.7		Case 6	6.1	10.6	12.1	19.2	17.2
	7	20.6	39.4	37.8	28.1	42.4		Case 7	6.3	12.1	10.1	6.8	18.5
	8	15.3	16.2	33.1	43.2	33.1		Case 8	9.3	7.4	15.2	12.5	17.1
	9	29.3	24.2	24.1	45.7	33.3		Case 9	3.6	5.9	5.4	12.0	5.4
	10	13.2	11.1	14.3	29.4	42.1		Mean $\pm$ SD	6.5 $\pm$ 4.0	11.4 $\pm$ 4.5	15.8 $\pm$ 7.1	18.3 $\pm$ 7.2	23.3 $\pm$ 12.2
	11	24.3	32.5	23.4	34.1	32.2		<div><div></div><div>※</div><div></div></div>					
	12	46.6	72.0	63.8	53.2	71.0		<div><div></div><div>※</div><div></div></div>					
	Mean $\pm$ SD		25.5 $\pm$ 15.9	35.4 $\pm$ 22.5	34.5 $\pm$ 17.3	36.9 $\pm$ 15.5		40.5 $\pm$ 17.0	<div><div></div><div>※</div><div></div></div>				
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></div>							<div><div></div><div>※</div><div></div></div>						
<div><div></div><div>※</div><div></div></</div>

図1 LAK activity and γ -IFN concentration of the culture supernatant

また、前述の方法に基づき γ -IFN 40 U/ml 添加による LAK 活性の増強効果を検討した。

12) 推計学的処理

推計学的処理は Student's t 法あるいは対応にある場合の t 検定によった。

III. 結 果

1. LAK 活性の測定

rIL-2 を 30 ng/ml 添加した際に誘導される LAK 活性 (mean $\pm$ SD) は、健常者、LC、LAK 活性正常 HCC 群、LAK 活性低値 HCC 群においてそれぞれ $42.2 \pm 16.7\%$, $37.4 \pm 11.6\%$, $50.8 \pm 11.8\%$, $7.5 \pm 5.9\%$ であった (図 1)。

2. Tac 抗体の LAK 活性誘導および培養上清中 γ -IFN 濃度に及ぼす影響

Tac 抗体 4%, 8%, 16% v/v 濃度添加により培養上清中の γ -IFN 濃度は 130.0 U/ml (非添加) からそれぞれ 103.0 U/ml, 56.6 U/ml, 36.1 U/ml と容量依存性に低下し、LAK 活性も Tac 抗体を 16% v/v 濃度に添加する

ことにより 41.6% の抑制を受けた。また、対照実験では有意の LAK 活性の抑制は認められなかった。

3. 抗 γ -IFN 抗体による LAK 活性誘導の阻害

抗 γ -IFN 抗体 0.625%, 1.25%, 2.5%, 5%, 10%, 20%, 40% v/v 濃度添加によりおのおの $1.3 \pm 1.6\%$, $3.3 \pm 3.7\%$, $23.4 \pm 18.0\%$, $58.8 \pm 13.9\%$, $73.4 \pm 12.8\%$, $93.4 \pm 3.0\%$ の LAK 活性の阻害を認め、用量依存性に阻害効果は増した。また、対照実験では有意の抑制は認められなかった (図 2)。

4. LAK 活性誘導時培養上清中の γ -IFN 濃度

rIL-2 30 ng/ml による LAK 活性誘導時の培養上清中に検出される γ -IFN 濃度 (mean $\pm$ SD) は、健常者、LC、LAK 活性正常 HCC 群、LAK 活性低値 HCC 群においてそれぞれ 37.1 ± 33.1 U/ml, 67.2 ± 60.4 U/ml, 21.5 ± 17.4 U/ml, 6.0 ± 10.8 U/ml で、LAK 活性低値 HCC 群では、健常者、LC に比し 1% 以下の危険率で、LAK 活性正常 HCC 群に比し 5% 以下の危険率で有意な低値が認められた (図 1)。また、図 3 に示すように添加する rIL-2

図 2 Inhibitory effects of anti γ -IFN on LAK induction

図 4 Time course of recombinant IL-2 (30 ng/ml) induced γ -IFN production

量を 30 ng/ml, 150 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/ml と増加させても, LAK 活性低値 HCC 群では γ -IFN 濃度の著増を認めなかった. さらに, rIL-2, 30 ng/ml による末梢血単核球刺激時に培養上清中の γ -IFN 濃度を経時的に観察したが (図 4), 健常者では 48~72 時間培養で γ -IFN 濃度が著増したのに対し, LAK 活性低値 HCC 群では 7 日間の培養中, 著増は認められなかった.

図 3 Effects of recombinant IL-2 at various concentrations on γ -IFN production

図 5 Correlation between LAK activity and γ -IFN concentration in the culture supernatant

5. LAK 活性と LAK 活性誘導時の培養上清中 γ -IFN 濃度との関係

LAK 活性と γ -IFN 濃度間の相関係数は, 健常者では 0.23, LAK 活性正常 HCC 群では 0.07, LAK 活性低下 HCC 群では 0.52 と LAK 活性と γ -IFN 濃度の間には明らかな相関は認められなかった (図 5).

6. Recombinant γ -IFN による LAK 活性の増強効果

添加する r- γ IFN 濃度がそれぞれ 0 U/ml, 10 U/ml, 20 U/ml, 40 U/ml, 80 U/ml の時健康者ではそれぞれ $25.5 \pm 15.9\%$, $35.4 \pm 22.5\%$, $34.5 \pm 17.3\%$, $36.9 \pm 15.5\%$, $40.5 \pm 17.0\%$, LAK 活性低値 HCC 群では $6.5 \pm 4.0\%$, $11.4 \pm 4.5\%$, $15.8 \pm 7.1\%$, $18.3 \pm 7.2\%$, $23.3 \pm 12.2\%$ と r- γ IFN の添加により LAK 活性は両群ともに有意に増強された ($p < 0.01$) (表 2). また, LAK 活性正常 HCC 群でも r- γ IFN 40 U/ml の添加により $51.5 \pm 12.8\%$ から $66.6 \pm 12.1\%$ へ増強した ($p < 0.01$).

7. 「培養上清中 γ -IFN 濃度が低値で LAK 活性高値例」の検討

抗 γ -IFN 抗体 40%, 20%, 10%, 5% v/v 濃度添加により case 18 ではおのおの 72.7%, 64.9%, 19.5%, 19.6%, case 19 ではおのおの 70.0%, 52.2%, 34.5%, 9.5% の阻害効果を認めた (図 2).

8. 単核球亜分画の測定

健康者群と LAK 活性低値 HCC 群との間には, 単核球亜分画頻度に明らかな偏位は認められなかった (表 3).

9. Negative selection による LAK 活性および培養上清中 γ -IFN 濃度の検討

Leu 7 分画あるいは Leu 11b 分画除去により LAK 活

性, γ -IFN 濃度は LAK 活性正常 HCC 群, 健康者においてともに低下を示した ($p < 0.01$) (表 4). また, Leu 7 あるいは Leu 11b 分画を除いた分画による LAK 活性誘導系に r- γ IFN 40 U/ml を添加しても LAK 活性の有意の増強は認められなかった.

IV. 考 察

LAK 細胞は末梢血単核球, リンパ節細胞や脾細胞を IL-2 とともに培養することにより抗原刺激なしで誘導される細胞集団であり, NK 細胞非感受性の癌細胞に対しても傷害作用を有する¹⁾. 近年, LAK 細胞を用いた養子免疫療法が各種癌患者に試みられ, 有効性が報告され

表 3 Peripheral mononuclear cell subpopulations in HCC patients with low LAK activity

	healthy volunteer (n = 10)	HCC* (n = 10)
OKT3 ⁺	68 ± 5%	66 ± 8%
OKT4 ⁺	36 ± 7%	42 ± 9%
OKT8 ⁺	25 ± 6%	23 ± 8%
OKT4 ⁺ /OKT8 ⁺	1.3 ± 0.4	1.1 ± 0.4
Leu7 ⁺	15 ± 5%	13 ± 7%
Leu11b ⁺	20 ± 6%	15 ± 8%

*HCC : hepatocellular carcinoma with low LAK activity

表 4 Effects of deletion of peripheral mononuclear cell subpopulation on LAK activity and γ -IFN production

LAK activity (%)				
	healthy volunteer		HCC [#]	
	none	γ -IFN ^{⊕***}	none	γ -IFN ^{⊕***}
not treated	55.6 ± 8.3	64.5 ± 10.3	53.8 ± 13.4	72.3 ± 5.1
Leu 7 ^{-ve*}	38.8 ± 13.0	46.0 ± 15.3	33.5 ± 11.8	36.8 ± 16.1
Leu 11 ^{-ve**}	30.8 ± 10.3	34.2 ± 10.7	17.5 ± 4.2	19.0 ± 2.5

γ -IFN concentration (U/ml)		
	healthy volunteer	HCC [#]
not treated	65.3 ± 1.1	38.3 ± 9.3
Leu 7 ^{-ve*}	11.8 ± 1.9	7.3 ± 0.2
Leu 11 ^{-ve**}	19.8 ± 3.2	5.0 ± 0.3

[#]HCC : hepatocellular carcinoma with normal LAK activity

*Leu 7^{-ve} : Leu 7⁺ subpopulation deleted

**Leu 11^{-ve} : Leu 11⁺ subpopulation deleted

*** γ -IFN[⊕] : Addition of recombinant γ -IFN (40 U/ml)

つつある^{9,10)}, われわれはすでに, HCC に対し LAK 細胞による養子免疫療法を施行するにあたり, HCC の LAK 活性が健常者に比し低下していることを報告した⁵⁾. さらに, 多数の HCC の検討により, HCC においても LAK 活性が健常者と同等に誘導される症例が存在し, 群内検定により LAK 活性正常群と低値群に分かれることが明らかとなった⁶⁾. このような事実に基づき, LAK 活性誘導機構および, HCC における LAK 活性低値の機序について検討を加えた.

LAK 活性は高濃度の IL-2 を単独で培養系に添加することにより誘導されるので, IL-2 が単核球の細胞膜に存在する IL-2 レセプターとの結合により誘導が開始されると考えられる. われわれはまず, IL-2 レセプターを認識する Tac 抗体¹¹⁾を健常者の LAK 活性誘導系に添加し, LAK 活性への影響を検討した. さらに, その培養上清につき, NK 活性増強¹²⁾や CTL の誘導に重要¹³⁾であるとされている γ -IFN 濃度を測定した. その結果, Tac 抗体の用量依存性に上清中の γ -IFN 濃度は減少し, 高濃度の Tac 抗体下では LAK 活性の部分的抑制も認められた.

そこで, LAK 活性発現における γ -IFN の関与を検討するために抗 γ -IFN 抗体を健常者の LAK 活性誘導系へ添加すると, 抗 γ -IFN 抗体用量依存性に LAK 活性が抑制された. LAK 活性低値 HCC 群では LAK 活性誘導時の培養上清中 γ -IFN 濃度は, 健常者に比し明らかな低下を示し, 誘導開始時 γ -IFN の添加により LAK 活性の増強が観察された. これらの成績から, LAK 活性誘導に γ -IFN を介する機構の関与が示唆される.

しかし, HCC では培養上清中 γ -IFN 濃度が低値ながらも LAK 活性が誘導される症例や γ -IFN 産生は十分ながら LAK 活性が低値を示す症例が存在する (図 1). γ -IFN 濃度低値で LAK 活性正常 HCC 症例も抗 γ -IFN 抗体添加により LAK 活性が抑制され, LAK 活性誘導における γ -IFN の重要性が示された. しかし, これら症例の存在は γ -IFN 産生能以外に前駆細胞や細胞相互作用など LAK 活性低下を惹起する要因の存在を示唆する.

LAK 前駆細胞の population については NK 細胞が主たる前駆細胞とする報告¹⁴⁾のほか, T 細胞も¹⁵⁾, または B 細胞も含め IL-2 に反応するすべての細胞が LAK 活性を獲得するという報告¹⁶⁾がある. 今回, 単核球系分画の検討では LAK 活性低値 HCC 群の末梢血に特定の偏位は認めなかった.

そこで, LAK 細胞の主たる前駆細胞と考えられる NK 細胞分画を Leu 7, Leu 11b 抗体¹⁷⁾にて negative selec-

tion し, LAK 活性正常 HCC 群および健常者における LAK 活性および LAK 活性誘導時の培養上清中 γ -IFN 濃度, γ -IFN 添加による LAK 活性の変動について検討した. Leu 7 分画あるいは Leu 11b 分画を除くと, LAK 活性, γ -IFN 濃度は両群ともに除去前に比して低下するものの, LAK 活性低値 HCC 群に比して, γ -IFN 濃度は同等以上, LAK 活性は依然高値を示した. この事実, LAK 前駆細胞は Leu 7 分画, Leu 11b 分画以外にも存在することを示す成績であり, LAK 活性低値 HCC 群では LAK 前駆細胞の傷害が末梢血単核球系分画の広範に及んでいることを示唆している. また, 健常者, LAK 活性正常 HCC 症例の Leu 7 あるいは Leu 11b 分画除去単核球による LAK 活性誘導に際し, γ -IFN の添加による LAK 活性の有意な増強が認められないことより, γ -IFN 添加による LAK 活性の増強は Leu 7 あるいは Leu 11b 細胞分画が主に関与していると想定される.

以上の成績から, LAK 活性誘導に γ -IFN が作用するのは主として NK 分画と考えられ, HCC の LAK 活性低下は γ -IFN 産生障害のみでなく, LAK 前駆細胞より LAK 細胞への分化過程における異常の関与が示唆された.

V. 結 語

肝細胞癌患者 (HCC) の LAK 活性正常群, LAK 活性低値群, および健常者を対象に末梢血単核球から誘導される LAK 活性の発現に関与する因子, および HCC における LAK 活性低下の機序について検討し以下の成績を得た.

(1) 健常者末梢血単核球を用いた LAK 活性誘導の際, 抗 IL-2 レセプター抗体 (Tac 抗体) の添加により用量依存性に培養上清中の γ -IFN 濃度の低下, および高濃度の Tac 抗体下で LAK 活性の抑制が観察された.

(2) 健常者末梢血単核球を用いた LAK 活性誘導は, 抗 γ -IFN 抗体により用量依存性に抑制された.

(3) LAK 活性低値 HCC では, LAK 活性誘導時の培養上清中 γ -IFN 濃度低下, γ -IFN 添加による LAK 活性の増強が観察された.

(4) 健常者, LAK 活性正常 HCC 群, LAK 活性低値 HCC 群において, LAK 活性と LAK 活性誘導時の培養上清中 γ -IFN 濃度の間には明らかな相関は認められなかった.

(5) LAK 活性誘導時の培養上清中 γ -IFN 濃度が低値にもかかわらず LAK 活性が正常を示した HCC でも, 抗 γ -IFN 抗体添加により LAK 活性誘導の阻害が

認められた。

(6) 肝細胞癌患者末梢血単核球亜分画は、健常者末梢血単核球亜分画と比べ有意の変動を認めなかった。

(7) 健常者および LAK 活性正常 HCC 群において、Leu 7 あるいは Leu 11b 分画除去により、LAK 活性および LAK 活性誘導時の培養上清中 γ -IFN 濃度は低下するが、LAK 活性低値 HCC に比して γ -IFN 濃度は同等以上、LAK 活性は依然高値であり、またその低下した LAK 活性は γ -IFN の添加により有意の増強は認めら

れなかった。

稿を終るにあたり、Tac 抗体を分与下さった京都大学第 1 内科内山卓先生に深謝いたします。

本論文の要旨は第 15 回日本臨床免疫学会総会（札幌）において発表した。また、本研究の一部は昭和 62 年度文部省科学研究費補助金奨励研究（A）課題番号 62770476 の援助を得て行われた。

文 献

- Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z. 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.
- Grimm, E.A., Robb, R.J., Roth, J.A. et al. : Lymphokine-activated killer cell phenomenon III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. *J. Exp. Med.*, 158 : 1356~1361, 1983.
- Son, K., Kew, M., Rabson, A.R. : Depressed natural killer cell activity in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 50 : 2820~2825, 1982.
- 高後 裕・石谷邦彦・新津洋司郎・他：癌患者にみられる免疫エスケープ機構。臨床免疫, 16 : 130~132, 1984.
- 栄枝弘司・西原利治・大西三朗：肝細胞癌における natural killer 細胞活性および lymphokine-activated killer 細胞活性の検討と血清中の両活性阻害因子の検索。肝臓, 28 : 727~734, 1987.
- 松浦 靖・西原利治・松永洋一・他：肝細胞癌患者における Lymphokine activated killer 細胞活性と臨床的及び免疫学的成績との比較検討。肝臓, 29 : 562~563, 1988.
- Naruo, K., Hinuma, S., Kato, K. et al. : Comparison of the biological properties of purified natural and recombinant human interleukin-2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 128 : 257~264, 1985.
- Uchiyama, T., Broder, S., Waldmann, T.A. : A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells. *J. Immunol.*, 126 : 1393~1397, 1981.
- Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M. et al. : Special report; Observations on the systemic administration of autologous lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *The New Eng. J. of Med.*, 313 : 1485~1492, 1985.
- West, W.H., Tauer, K.W., Yannelli, J.R. et al. : Constant-infusion recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer. *The New Eng. J. of Med.*, 316 : 898~905, 1987.
- Leonard, W.J., Depper, J.M., Uchiyama, T. et al. : A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor; partial characterization of the receptor. *Nature*, 300 : 267~269, 1982.
- Weigent, D.A., Langford, M.P., Fleischmann, W.R. et al. : Potentiation of lymphocyte natural killing by mixtures of alpha or beta interferon with recombinant gamma interferon. *Infect. and Immun.*, 40 : 35~38, 1983.
- Farrar, W.L., Johnson, H.M., Farrar, J.J. : Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2. *J. Immunol.*, 126 : 1120~1125, 1981.
- Itoh, K., Tilden, A.B., Kumagai, K. et al. : Leu-11⁺ lymphocytes with natural killer (NK) ac-

- tivity are precursors of recombinant interleukin 2 (rIL-2)-induced activated killer (AK) cells. J. Immunol., 134 : 802~807, 1985.
- 15) Burns, G.F., Triglia, T., Werkmeister, J.A. : *In vitro* generation of human activated lymphocyte killer cells : separate precursors and modes of generation of NK-like cells and "anomalous" killer cells. J. Immunol., 133 : 1656~1663, 1984.
- 16) Damle, N.K., Doyle, L.V., Bradley, E.C. : Interleukin 2-activated human killer cells are derived from phenotypically heterogeneous precursors. J. Immunol., 137 : 2814~2822, 1986.
- 17) Lanier, L.L., Benike, C.J., Phillips, J.H. et al. : Recombinant interleukin 2 enhanced natural killer cell-mediated cytotoxicity in human lymphocyte subpopulations expressing the Leu 7 and Leu 11 antigens. J. Immunol., 134 : 794~801, 1985.
-