悪 性 腫 瘍 と 免 疫

漆 崎 一 朗 ・ 高 後 裕

Cancer and immunity

Ichiro Urushizaki and Yutaka Kohgo

Department of Internal Medicine Sapporo Medical College

【Summary】

The development of modern tumor immunology based on animal tumor models demonstrated the presence of tumor-specific antigens and the ability of tumor-specific immunity to protect against tumor cell challenge. However, neither of these characteristics are readily attributed to many human cancers. Although in certain animal models induced by virus or carcinogen, antigen-specific T cell (CTL) play an important role against tumor cell killing, the role of specific CTL is not so clear in human cancer.

Recently, Brimm et al reported that peripheral blood leukocytes from cancer patients could be activated in culture in preparation of interleukin-2 (IL-2), resulting in the development of effector cells cytotoxic for autologous fresh solid tumor cells. The IL-2-mediated activation of PBL to become cytotoxic to fresh autologous solid tumor cells probably reflects a common and non-specific activation mechanism of the host. As the anomalous killer cells distinct from CTL and NK cell, lectin-activated killer, alloantigen-activated killer and lymphokine-activated killer are included.

These cell killings were examined to the PBL of cancer patients.

Lymphokine-activated killers represent a unique and fundamental cytotoxic effector system that may play a role in immune surveillance against NK resistant solid tumor cells, and may have a possible role in the adoptive immunotherapy of tumors.

The generation of an immune response requires not only the appropriate interaction of cells from the monocytic and lymphoid lineages but also the release of appropriate cytokine by these cell populations. Evidence is accumulating that many of the functions attributed to lymphocytes and monocytes are actually mediated by the cytokines they release. IL-2 is a lymphokine that is released by T cells after appropriate stimulation. IL-2 production activity in peripheral T cells of cancer patients was examined using IL-2 dependent T CTLL cell lines. The action of IL-2 is of the essential growth factor supporting the *in vitro* proliferation of T suppressor/cytotoxic cells, lymphokine-activated and NK cells. Furthermore, IL-2 enhances the functional activity of both lymphokine-activated and NK cells.

The adoptive immunotherapy using IL-2 will be effective to cancer patients. Tumor necrosis factor (TNF) in one of monokine which has marked anti-tumor activity *in vitro* and *in vivo* experiments.

Recently human recombinant IL-2 and TNF have been made in my country. The availability of molecular-cloned IL-2 and TNF offers the great advantages to the patients.

Key words: cancer immunity,
effector cell against cancer,
anomalous killer cell,
adoptive immunotherapy,
interleukin 2,
tumor necrosis factor

I. はじめに

腫瘍抗原に特異的な細胞障害性 T 細胞 cytotoxic T cell (CTL) による抗腫瘍性作用は動物実験系で明らかにされている。しかし一度、ヒト悪性腫瘍についてみると、腫瘍増殖の免疫学的抑制はもとより、免疫応答の存在を証明することが困難な場合も少なくない。ヒト悪性腫瘍の免疫機構をめぐっては抗腫瘍性に働く effector 機構の分析が重要であると考えられる。とくに最近、非特異的 effector 細胞の細胞障害性作用が注目されてきており、ここでは anomalous killer cells について検討を加えた。さらに最近の biotechnology の進歩は、effector 細胞の産生する各種 cytokine の精製、性状および量を明らかにした。癌患者末梢血単核球の interleukin-2 (IL-2) 産生能とその調節機構を詳述し、cytokine を用いる新しい癌の免疫療法について、IL-2 の adoptive immunotherapy と tumor necrosis factor (TNF) 腫瘍壊死因子の臨床応用につき概説した。

II. 抗腫瘍性に働くヒトの effector 機構

癌患者の細胞性免疫能を知る parameter として、これまでに末梢血 T 細胞数、遅延型皮膚反応、さらに末梢血リンパ球の幼若化反応が実施され、それぞれの低下が報ぜられたが、これらは直接抗腫瘍性機構を意味するものではない。ヒト悪性腫瘍に対し抗腫瘍性に働く effector 機構の研究は 1970 年代以降免疫学の進歩とともにその変遷が認められる。その概要は図 1 に模式的に示してあるが、当初は抗原特異的 CTL が動物実験の結果から示されるように主役を演じてきたが、しかしその後 ADCC の関与する K 細胞、つづいて natural killer (NK) 細胞、マクロファージにはじまり、anomalous killer 細胞、さらに顆粒球など非特異的な effector 細胞

の占める割合が次第に重視されてきている¹⁾。

1. 特異的 effector 細胞

1) T 細胞

悪性腫瘍の排除に働く免疫機構としては細胞性免疫が主体であり、その担い手は T 細胞が中心であるとされているが、その T 細胞にも subset があり、腫瘍細胞を破壊する T 細胞は CTL, killer T 細胞と呼ばれ、その作用の発現にはほかの T 細胞が関与している。発現を強める helper および amplifier T 細胞があり、逆にそれを抑える suppressor T 細胞がある。両者の balance の上に killer T 細胞が作用するといえる²⁾。killer T 細胞が作用する場合、腫瘍特異抗原を認識する必要性があるが、そのほかの T 細胞もまた抗原を認識して killer T 細胞へ働くのである。したがって細胞障害試験は重要な test であり、リンパ球腫瘍混合培養³⁾、白血球粘着阻止反応⁴⁾などから、腫瘍に特異的 killer T 細胞 (CTL) の存在が示された。その後抗原に特異的な CTL の認識には組織適合性抗原の拘束性があること、標的細胞の特異性が必要なことから抗腫瘍性にはいくつかの問題点が生じ CTL の測定は現在一般化されてはいない。

2) ADCC 活性

ADCC 活性はマクロファージあるいはリンパ球の subset の 1 つである K 細胞のもつ Fc receptor を介する細胞障害性反応であるが、ADCC 抗体は腫瘍に特異的である⁵⁾。K 細胞による ADCC 活性の程度は肺癌患者の生存期間と相関するとの報告もあるが、その役割はいまだ明らかではない。

2. 非特異的 effector 細胞

ヒト悪性腫瘍における特異的抗腫瘍免疫の証明はきわめて不十分であるが、これに対し 1975 年代以降は非特

ADCC : Antibody dependent cell cytotoxicity
 CTL : Cytotoxic T lymphocyte
 NK : Natural killer cell
 LAK : Lymphokine activated killer cell

図 1 ヒト悪性腫瘍における抗腫瘍性エフェクター

異的抗腫瘍免疫の研究が発展してきた。

1) マクロファージ

近年、マクロファージのもつ非特異的抗腫瘍性作用が動物およびヒトの腫瘍排除に働く役割として明らかにされてきた。Israel ら⁶⁾は *in vivo* での癌患者マクロファージの走化能を skin window test により検討し、予後と相関するとしている。マクロファージはT細胞の分泌する lymphokine, macrophage activating factor (MAF), 細菌菌体成分などにより活性化され、腫瘍細胞を非特異的に障害することが動物実験から示され、ヒトにおいても活性化マクロファージの抗腫瘍性作用が注目されている。とくにマクロファージの産生する tumor necrosis factor (TNF) 腫瘍壊死因子の抗腫瘍性作用が興味をもたれている。

2) NK 活性

ヒト natural killer (NK) 活性は末梢血および脾臓のリンパ球様細胞に認められる。癌患者の NK 活性については用いる標的細胞の種類により結果は必ずしも一致していない。われわれは末梢血から単核球を分離し、10% FCS 加 RPMI 1460 培養液にて 1×10^6 個/ml に調整し、K 562 細胞を標的細胞として E : T 比 40 : 1 で ^{51}Cr release assay 法を用いて細胞障害活性を測定している。Pross ら⁷⁾およびわれわれ⁸⁾は種々の癌患者において NK 活性を測定し、腫瘍が限局している場合には変動がないが、広範な進行癌では明らかに低下することを示した。

3) Non-NK 細胞—anomalous killer cells

最近非特異的 killer 細胞のうち non-NK 細胞群として表 1 に示すような PHA で刺激誘導される PHA-activated killer (PAK), allo 抗原で刺激誘導される alloantigen-activated killer (AAK) さらに lectin や allo 抗原では刺激されず lymphokine である IL-2 の

みで誘導される lymphokine-activated killer (LAK) などが含まれ^{9,10)}、全体として anomalous killer と総称されているものが、ヒト悪性腫瘍の抗腫瘍性免疫機構の 1 つとして注目されてきているので項を別にして詳述したい。

III. Anomalous killer cells

近年、抗腫瘍免疫機構を担う細胞群として、PAK, AAK および LAK などの anomalous killer と総称される非特異的細胞群が注目されていることを述べた。このうち Interleukin-2 により誘導、活性される lymphokine-activated killer cells (LAK) の果たす役割が重視されている。

1. 活性の測定法

1) PAK 活性

末梢単核球 (1×10^6 個/ml) を PHA-P10 $\mu\text{g/ml}$ の存在下で 72 時間刺激培養し、培養後の生細胞と effector 細胞とした。標的細胞には NK 非感受性である Daudi 細胞とし、E : T 比 40 : 1 で ^{51}Cr release assay 法を用いて細胞障害活性を測定した。

2) Augmented AAK 活性

正常人末梢単核球 (1×10^6 個/ml) をあらかじめ 2,000 Rad X 線照射し、増殖能を失わせ allogenic cell とし、癌患者または健康人末梢単核球 (1×10^6 個/ml) と等量に混和し、human recombinant IL-2 を隔日に添加 (1 U/ml) 6 日間培養した。培養後の生細胞を effector 細胞とした。Daudi 細胞を用い E : T 比 40 : 1 にて ^{51}Cr release assay 法により細胞障害活性を測定した。

3) LAK 活性

末梢単核球 (1×10^6 個/ml) に IL-2 を隔日添加 (1 U/ml) 6 日間培養した。培養後の生細胞を effector cell と

表 1 非特異的キラー細胞の分類

- i) NK細胞 (Natural killer.)
 ii) Non NK細胞 (Anomalous killer.)
 ① PHA activated killer (PAK)
 ② Alloantigen activated killer (AAK)
 ③ Lymphokine activated killer (LAK)

《非特異的キラー細胞活性の測定方法》

図 2 非特異的キラー細胞の標的細胞特異性

した。Daudi 細胞を標的細胞として E : T 比 40 : 1 にて ^{51}Cr release assay 法により細胞障害活性を測定した。

このようにして誘導した killer 細胞の細胞障害性を K562, Daudi 細胞を標的細胞として検討した。図 2 に示すように正常人末梢単核球の NK 活性は K562 に対し 60.4%, Daudi に対して 4.8% であった。これに対し PAK augmented AAK, LAK 活性は NK 非感受性で

あった Daudi 細胞に対して高い細胞障害性活性を示した。とくに十分量の IL-2 を投与して誘導した augmented AAK, LAK などにより高い細胞障害活性を示した。

2. ヒト由来腫瘍細胞株に対する活性

各種ヒト由来腫瘍細胞株に対する NK・PAK, LAK 活性の細胞障害活性をみた。図 3 に示すように E : T 比

	K562	KATOIII	HGC25	RPMI 4788	M7609	HMV	Daudi	U937
NK	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
PAK	(++)	N.D	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(++)
LAK	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(++)	(++)	(++)

% Cytotoxicity. 60%~ (++)
 40%~59% (+)
 10%~39% (+)
 0%~9% (-)

K562: Erythroleukemia cell line.
 KATOIII: Stomach cancer cell line.
 HGC25: Pancreatic cancer cell line.
 RPMI4788: Colon cancer cell line.
 M7609: Colon cancer cell line.
 HMV: Melanoma cell line.
 Daudi: Burkitt's lymphoma cell line.
 U937: Histiocytic lymphoma cell line.

図3 各種ヒト腫瘍培養株に対する非特異的キラー細胞の細胞障害性作用

40:1で実施した細胞障害性を60%以上(++)、40~59%を(+), 10~39%を(+), 0~9%を(-)で示すと、NK細胞はK562とU937に対して細胞障害性を示したのに対し、anomalous killer細胞群では、PAK活性はK562, Daudi, U937に対して、LAK活性は表示したすべての細胞に対して高い細胞障害活性を示した。またLAK細胞は正常リンパ球、レクチン刺激リンパ芽球に対して細胞障害活性を示さなかった。

3. ヒト末梢血中のLAK細胞の局在と表面マーカー

健康人より分離した末梢単核球からマクロファージで分離用プレート(MSP-プレート, 日本抗体研究所)にて付着細胞を除去後、percoll密度1.055, 1.061, 1.069, 1.080 g/mlの不連続密度勾配に静かに重層し、400 g, 30分間遠心した。遠心後図4に示すごとく、A, B, Cの3分画を回収した。A, B, Cの3分画について、各killer活性を、K562, Daudi細胞を標的細胞として⁵¹Cr release assay法を用いて測定した。A分画はK562細胞に対して軽度の細胞障害活性を認めたが、Daudi細胞に対しては認められなかった。細胞表面マーカーはOKT 3, 8, 9とOKI₄₁の陽性率が高かった。B分画はK562に対して細胞障害活性がみられ、細胞表面マーカーはleu 7の陽性率が高かった。C分画はK562, Daudi細胞に対して明らかな細胞障害活性は認められず、細胞表面マーカーはOKT 3, 4の陽性率が高かった。

次にA, B, C各分画をIL-2隔日投与にて6日間培養し、培養後のeffector細胞のK562, Daudi細胞に対する細胞障害活性および細胞表面マーカーにつき検討した。A分画ではIL-2刺激後、K562, Daudi細胞に

対する高い細胞障害活性を示し、表面マーカーはOKT 3, 4, 8, 9, OKI₄₁の陽性率が高く、B分画ではK562に対し高い活性を示し、Daudi細胞に対して弱い細胞障害活性を示し、表面マーカーではleu 7の陽性率が高値であった。C分画ではK562, Daudi細胞に対して明らかな細胞障害活性はみられず、表面マーカーにも有意な変化を認めなかった。以上より低比重領域のA分画よりLAK活性が誘導され、この分画の表面マーカーはOKT 3, 4, 8, 9 OKI₄₁陽性の活性化T細胞であると考えられた。

次にpercoll密度勾配法で分画した5つの末梢血リンパ球の亜分画についてNK活性, PAK活性, AAK活性およびLAK活性の局在を検討した。未処理群ではFr. 2, 3にK562に対する細胞障害性癌を認めたが、Daudi細胞に対してはいずれの分画も細胞障害活性を示さず、Fr. 2, 3にはNK活性が存在した。Fr. 1~5の各分画をIL-2で刺激誘導した結果、Fr. 1, 2の分画からK562, Daudi細胞に対する細胞障害活性を認め、LAK活性が誘導された。PHAまたはallo抗原で刺激誘導した結果、PAK活性およびAAK活性はFr. 4, 5から誘導され、K562, Daudi細胞の両者に細胞障害活性を示した。以上のことはanomalous killer cellsは末梢血中でそれぞれ異なった細胞群であることを示している。

4. 正常および癌患者末梢単核球から誘導されたanomalous killer cellの細胞障害活性

図5に示したようにPAK活性は癌患者では正常者に比べて有意に低い傾向を示した。IL-2を十分量投与したaugmented AAK活性, LAK活性は癌患者において正

図 4 非特異的キラー細胞の局在と細胞表面マーカー

常者群と有意差を認めず、高い細胞障害活性を示した。したがって PAK 活性が癌患者で低値を示す原因として、癌患者末梢血リンパ球からの IL-2 産生能の低下が考えられる。

正常者および癌患者の末梢血単核球の LAK 活性を、NK 非感受性細胞株である Daudi, HMV, HGC 25 を標的細胞として測定したところ、両群に有意差を認めなかった。次に標的細胞として胃癌 2 例、大腸癌 1 例、乳癌 1 例の胸腹水癌細胞を用い、effector 細胞として正常者および癌患者の末梢血単核球により E : T 比 20 : 1 で PAK, aug・AAK および LAK 活性を測定した。図 6

に示すようにヒト胸腹水癌細胞に対し、PAK, aug・AAK, LAK ともに有意な細胞障害活性を認めたが、ヒト白血病細胞に対しては有意ではなかった。

IV. 癌患者末梢血単核球の Interleukin 2 産生能とその調節機構

1. Interleukin

液性および細胞性免疫反応は、T および B リンパ球や単球、マクロファージ系細胞の複雑な network からなり、特異的な抗原情報の伝達とともに、それに伴い上記細胞群から産生される可溶性物質が重要な役割をもつこ

図5 正常および癌患者末梢単核球から誘導した非特異的キラーT細胞の培養癌細胞 (Daudi cell) に対する細胞障害活性作用

とが明らかにされてきた。それらの可溶性物質は lymphokine と総称されるが、1979年に行われた 2nd International workshop of lymphokine において、白血球の相互作用を連結する因子として interleukin と呼ぶことが提唱され、大まかに単球、マクロファージ由来でリンパ球に働く interleukin 1 (IL-1) と、リンパ球相互に作用する interleukin 2 (IL-2) とに分類された¹¹⁾。その後 interleukin には、さらに IL-2 とは明らかに異なる分子種でT細胞由来の interleukin 3 (IL-3) も含まれることになった¹²⁾。表2は抗腫瘍性に働く cytokine を示しているが、lymphotoxin を加えた。IL-1 に関してはT細胞への関与のほかに線維芽細胞、肝実質細胞、好中球など、その標的細胞は多岐にわたり、免疫反応ばかりでなく、広い意味で炎症、感染、組織修復などに対する生体防御機構を司る cytokine として認識されてきている。ここでは抗腫瘍性を示す monokine として tumor necrosis factor (TNF) を加えた。cytokine としての妥当性は今後明らかにされよう。

2. 癌患者末梢血単核球の IL-2 産生能

担癌生体では各種マイトゲンによるリンパ球芽球化反応、リンパ球混合培養反応、NK 活性などが抑制され、細胞性免疫能が低下した状態にあることが知られてい

る。IL-2 は細胞障害性T細胞の誘導¹³⁾、NK 細胞の活性化¹⁴⁾など免疫応答の mediator として近年注目されている lymphokine である。実際に IL-2 が *in vitro* における細胞障害性T細胞の継代、増殖ばかりでなく、*in vivo* においても CTL が誘導される可能性があげられたり、また *in vitro* で誘導された CTL の生体内での効果を増強する作用など腫瘍免疫のなかで IL-2 の果たす役割は大きいものといわれている。われわれは進行癌の末梢血単核球の IL-2 産生能を IL-2 依存細胞であるマウス CTLL 細胞を用いて microassay で測定した¹⁵⁾。

MIT の H. Eisen 教授より供与をうけた mouse cytotoxic T cell line (CTLL) 細胞を 10% FBS, RPMI 1640 培養液で 4×10^4 個/ml に調整し、96 well flat bottlomed microtiter plate 100 μ l ずつ分注した後、正常人または各種癌患者末梢血より分離した単核球浮遊液を、培養液で 1×10^6 個/ml の濃度に調整し、PHA-P 10 μ g/ml で刺激し、37°C、5% CO₂ 存在下で 72 時間培養後の培養上清を IL-2 サンプルとして、-20°C に凍結保存したものを 10 μ l 添加した。24 時間 37°C で 5% CO₂ 存在下で培養後、tritiated thymidine 0.5 μ Ci で 4 時間 puls label 後、MASH フィルターに harvest し、液体シンチレーションカウンターで ³H-TdR incorporation を算出した。正常人 IL-2 サンプルを log 2

非特異的キラーT細胞の白血病細胞に対する細胞障害性

K.S. (CLL)	S.N. (Normal)	0 %	N.T.	0 %
	T.H. (脾 癌)	0 %	N.T.	0 %
H.S. (ALL)	S.N. (Normal)	N.T.	N.T.	3.6 %
	K.T. (Normal)	N.T.	N.T.	0 %
M.W. (AML)	M.I. (Normal)	N.T.	N.T.	0 %
	S.N. (Normal)	0 %	N.T.	0 %
	F.F. (大腸癌)	0 %	N.T.	N.T.

図 6 非特異的キラーT細胞のヒト胸腹水癌細胞に対する細胞障害性作用

dilution series で添加し, IL-2 microassay 法にて CTLL 細胞の ^3H TdR incorporation を測定し SI で示したところ, サンプルの 2^5 倍希釈から 2^2 希釈まで直線的な dose dependency を示し, IL-2 サンプルの活性測定には 10 倍希釈にて実施した¹⁶⁾.

健康人 22 名, 胃癌 11 名, 食道癌 2 名, 脾癌 4 名, 大腸癌 3 名, 合計 41 名の末梢単核球につき IL-2 産生能を測定したところ表 3 に示すごとく, SI は健康人 60.55 ± 29.55 に対し胃癌 10.96 ± 3.05 ; 食道癌 5.40, 脾癌 6.00 ± 2.45 , 大腸癌 10.05 ± 2.49 であり癌患者では原発に関係なく有意に IL-2 産生能の低下が認められた. 患者は進行期癌で未治療のものを対照とした. 次に胃癌患者を早期胃癌と進行癌に大別して, 異なった病期による

IL-2 産生能を検討した. 図 7 に示すように健康人 22 名, 早期胃癌 9 名, 進行胃癌 11 名の計 42 名について SI で示すと健康人 60.55 ± 29.55 に対し早期胃癌 41.15 ± 17.24 , 進行胃癌 10.96 ± 3.05 であり, 健康人と早期胃癌は t 検定で有意差を認めなかったが, 健康人と進行胃癌, 早期胃癌と進行胃癌とでは, ともに $P < 0.01$ で進行胃癌に有意の低下を認めた. 以上のことはいずれの進行癌でも共通して IL-2 産生の低下が存在することを示している. 一方正常者において IL-2 産生能に幅広い分布のみられることは low responder が存在することを示しているが, 実際にこれらの違いが各個人のほかの免疫反応の parameter とどう関連があるかは今後の課題といえよう.

表 2 抗腫瘍性機構に關与する cytokine

1. Lymphokines	
IL-2	Thymocyte mitogenic factor (Shaw, 1978) T cell growth factor(TCGF)(Morgan & Gallo, 1976) co-stimulator (Shaw, 1978) Killer cell helper factor(KHF)(Orosz, 1978) Secondary cytotoxic T-cell-inducing Factor(SCIF) (Wagner, 1978)
IL-3	(Ihie, 1981)
LT(Lymphotoxin)	(Ruddle & Waksman, 1968)(Granger, 1968)
INF- γ	(Falcoff, 1972)
2. Monokines	
IL-1(LAF) Mtogenic protein(MP)	
	Helper peak-1(HP-1) (Koopman, 1977)
	Tcell replacing factor III (TRF-III)
	Tcell replacing factor M ϕ (TRF-M)
	Bcell activating factor(BAF)(Wood, 1979)
	Bcell differentiation factor(BDF)
TNF	(Gery, 1972)

表 3 各種消化器癌患者末梢血単核球の IL-2 活性

	Case	IL-2 activity(S.I.)
Normal subjects	22	60.55 $\pm$ 29.55
Stomach Ca.	Early	9
	Advanced	11
Esophagus Ca.	2	5.40
Pancreas Ca.	4	6.00 $\pm$ 2.45
Colon Ca.	3	10.05 $\pm$ 2.49

表 4 癌患者末梢血単核球の IL-2 産生に關与する諸種要因

	Case	IL2 activity		
		Depressed	no change	recovered
Mo depletion	26	0	12	14
IL1 addition	6	0	6	0
Indomethacin treatment	26	0	20	6
PMA treatment	26	0	18	8

3. IL-2 産生能の低下機構

IL-2 産生低値を示した癌患者 26 例の IL-2 サンプル作製系に、おのおのマクロファージ除去, IL-1 添加,

図 7 正常人, 早期胃癌, および進行胃癌の末梢血単核球の IL-2 活性

indomethacin 添加, PMA 処理の 4 群をつくり IL-2 活性を測定した. 未処理の対照群に対し, 20% 以上の IL-2 活性の回復を認めたものを回復群, 20% 以上の減少をみたものを低下群, 20% 以内の変化を無変化群とし

て表4に示した。癌患者末梢単核球から、マクロファージ分離用特殊コーティングプレートを用い、マクロファージを除去したところ26例中14例にIL-2活性の回復を認めた。残り12例は無変化群であり、活性の減少はみられなかった。ヒトマクロファージ由来細胞U-937のPMA $1\mu\text{g/ml}$ 刺激培養上清を、sephadex G-25 カラムにて分画し、分子量約15,000の胸腺細胞増殖活性の高い分画をIL-1 sourceとして用いた。このIL-1分画を6例に添加したが、IL-2産生能の回復は認められなかった。indomethacin $1\mu\text{g/ml}$ 処理で6例に、PMA $1\mu\text{g/ml}$ 処理にて8例にIL-2活性の回復が認められた。

これら indomethacin, PMA 処理にて回復した例はすべてマクロファージ除去により、IL-2の回復を認めた例であった。表5に示すように indomethacin, PMAの再処理で回復を示した例が2例で、マクロファージ除去により活性を回復したが、indomethacin, PMA 処理の双方に回復を認めない例が3例存在した。

IL-2産生低下の機構については、マウスではT細胞由来の suppressive factor¹⁷⁾、マクロファージ¹⁸⁾、および prostaglandin (PG)^{19,20)} があげられている。われわれの26例の進行癌患者の検討では、14例、約半数が adherent 細胞を除去することでIL-2産生が回復すること、半数には抑制型マクロファージが関与しているものといえる。この場合IL-1の絶対的減少は関与していないものといえよう。単球、マクロファージ系のIL-2産生抑制が担癌群と正常群で量的、質的に差があるか否かが大切である。Bonnard ら¹⁸⁾は正常末血単核球はマクロファージから産生される prostaglandin によりIL-2産生が抑制されると、Choueib¹⁹⁾、Walker ら²⁰⁾もPGが正常者のIL-2産生の regulatory molecule であるとしている。教室の小野寺²¹⁾は担癌生体でのPG産生 suppresser macrophage の増加を報じ、今回のわれわれの結果でも担癌マクロファージによる、より強いIL-2産生の抑制が明らかである。このことは indomethacin によりIL-2産生が15例中6例40%に回復することから、抑制因子の1つがPGであることを示している。しかし他の9例は indomethacin に不応性であった。そこで分化誘導因子として知られる phorbol myristate acetate (PMA) で末梢単核球を処理したところ8例60%に抑制の回復が認められた。これはFarrar ら²²⁾がいうようにPMAがマクロファージに作用して抑制因子の産生を抑制しているためでT細胞の関与ではない。一方 indomethacin, PMA の両者でIL-2産生が相乗的に回復する例が2例、両者のいずれにも反応しない例が3

表5 IL-2産生に対するPMAと indomethacin 処置の影響

Indomethacin 処置	回復	4	2
	変化なし	3	6
		変化なし	回復
		PMA 処置	

例認められることは、マクロファージ由来の抑制因子はかなり多様であると考察される。今後詳細な分析が望まれる。

V. Cytokine による癌の免疫療法

近年、大量培養技術の進歩、無血清培養の開発に加えて、細胞工学、ことに細胞融合法、遺伝子組換えなどの分子生物学的な手技が、免疫学にも応用されるようになり、物質としての lymphokine の精製、大量生産、生物学的活性の検討が可能となってきた。すでに interferon にはじまりIL-2、さらに最近では tumor necrosis factor (TNF) 腫瘍壊死因子についても mRNA の抽出、cDNA の作製から大腸菌の組換えによるヒト recombinant cytokine の大量生産、その臨床応用の時代に入ってきている。生物学的活性物質の薬剤としての新しい癌治療である²³⁻²⁵⁾。

1. Interferon による免疫賦活

腫瘍に対する免疫学的監視機構を高める生物学的活性物質としてIFNはすでにphase studyに入っている。ヒトIFNは大別して α 、 β 、 γ の3種があり、代表的産生系はそれぞれの白血球あるいはBリンパ球、線維芽細胞、Tリンパ球とされている。天然型ヒトIFNはこれらの細胞を大量に培養して得られるが、効率の点からは recombinant IFN が用いられる。これらの3種のIFNについてはいずれも各種の免疫担当細胞を賦活させることが知られている²⁶⁾。 α -と β -型についてはすでに多くの施設でphase studyが実施されているが、残念ながらその結果は一部の腎癌、悪性黒色腫を除き特記すべきものではなかった²⁷⁾。 γ -IFNについては天然型の抗腫瘍

表 6 各種ヒト癌細胞に対する TNF の細胞障害性作用

1) 胃癌例

Case	Sex	Age	Histology	Stage	Immuno- chemother apy	Cytotoxicity*
1	T.N.	F 40	s P/D adeno ca.	II	(-)	47.9
2	S.S.	F 53	Ascites P/D adeno ca.	IV	(+)	27.4
3	T.K.	M 54	Ascites P/D adeno ca.	IV	(+)	13.0
4	K.M.	M 56	Ascites P/D adeno ca.	IV	(+)	75.5
5	M.T.	F 73	Ascites P/D adeno ca.	IV	(+)	42.9
6	H.N.	F 64	Ascites P/D adeno ca.	IV	(+)	27.5
7	T.Y.	M 54	Ascites P/D adeno ca.	IV	(+)	34.6
8	F.F.	F 62	Ascites P/D adeno ca.	IV	(+)	78.5
9	Y.T.	M 57	P/D adeno ca.	II	(-)	21.2
10	S.K.	F 71	Ascites P/D adeno ca.	IV	(+)	33.4
11	S.M.	F 42	Ascites P/D adeno ca.	IV	(+)	54.1
12	T.M.	M 60	Ascites M/D adeno ca.	IV	(+)	85.9
13	M.K.	M 62	W/D papillo tubular adeno ca.	II	(-)	7.1
14	H.O.	M 62	Ascites W/D adeno ca.	IV	(+)	11.6

*Relative cytotoxicity against the cytotoxicity of L929 cell determined by ⁵¹Cr cytotoxic release assay.

2) 癌疾患 (胃癌を除く)

Case	Sex	Age	Type of tumor	Histology	Cytotoxicity*
1	S.O.	M 40	Pancreas ca.(Ascites)	W/D adeno ca.	61.2
2	A.S.	M 66	Gallbladder ca.(Ascites)	P/D adeno ca.	19.2
3	K.K.	F 57	Hepatoma(Ascites)		35.7
4	K.O.	M 72	Lung ca.(Pl.effusion)	M/D adeno ca.	34.7
5	E.O.	F 66	Lung ca.(Pl.effusion)	P/D adeno ca.	47.2
6	T.K.	M 73	Urinary bladder ca.	Transitional cell ca.	19.8
7	K.N.	M 58	Renal cell ca.		23.4
8	T.F.	F 47	Ovarian ca.(Ascites)	Serous cyst adeno ca.	66.7
9	T.Y.	F 63	Uterus ca.(Ascites)		16.9

*Relative cytotoxicity against the cytotoxicity of L929 cell determined by ⁵¹Cr release assay.

効果が *in vitro*, *in vivo* の実験で高かったため期待されたが、この recombinant IFN を用いた phase study でやはり一部の骨髄腫、リンパ腫や胃癌、上咽頭癌の局所投与を除いては目立った効果が示されていない。ただ最近になり recombinant γ -IFN は天然型に比べて、N 末端に Cys-Tyr-Cys の 3 個のアミノ酸が余分についていることがわかった。これを除くと、生物学的活性の数倍に上がることが確認されている²⁸⁾。

2. IL-2 による Adoptive immunotherapy 養

子免疫療法

すでに記載したように担癌生体では IL-2 活性が一般

に低下しており、それが免疫監視能の低下につながっている。したがって当然 IL-2 を補充する方法が期待される。ヒト recombinant IL-2 を用いて行われてきた phase study では必ずしも画期的な効果は得られていない。その理由として血中からのクリアランスがきわめて早いこと、抑制細胞をも誘導する可能性があげられている。われわれの結果では癌患者に投与し、*in vivo* に LAK 活性の誘導されるのをみているが、もともと担癌生体には IL-2 に反応して活性化される effector 細胞がどの程度存在するか不明である。したがって今のところ IL-2 の直接投与には解決すべき点が多く、次の治療法がとられてきている。

Adoptive immunotherapy

これは IL-2 を直接患者に投与するかわりに患者から得られたリンパ球を *in vitro* でいちど IL-2 と反応させた後、患者にもどす方法である。ヒトでは CTL の存在が必ずしも明確ではなく、IL-2 receptor の出現した T 細胞がどれほどあるかも不明であるが、前述のように LAK 活性を示す killer 細胞を誘導する。このような非特異的な killer 細胞の増殖は十分に抗腫瘍効果が期待される。この方法では IL-2 の血中からのクリアランスや不活化の問題がなく、また check することで腫瘍細胞に障害性を示す effector 細胞のみを使用することができることから、的確な臨床効果が期待されることになる。事実動物実験的には明らかな抗腫瘍効果と延命効果がみられている^{29,30)}。これから臨床応用が始まろうとしているが、どのような投与方法が有効か今後の問題であるが、同時に IL-2 の投与がさらに有効性を高めるといえる。

3. 抗腫瘍性 cytokine による癌治療

ある種の細胞から得られる活性物質のなかには直接腫瘍細胞に働いて、その増殖性を抑制したり、細胞障害作用を示すものである。この代表的なものとして lymphotoxin^{32,33)} と tumor necrosis factor^{34,35)} などが知られている。ここでは tumor necrosis factor (TNF) をとりあげたい。

TNF はマクロファージに由来する殺腫瘍性の polypeptide で、したがって抗腫瘍作用が強力であることに加えて、標的細胞特異性が腫瘍だけに限られている点で注目される。詳細は著者らの論文³⁶⁻³⁹⁾によっていただきたいが、分子量は 44,000 から 55,000 程度で糖成分を欠く 2 本の subunit から構成されている。最近、日・米で

ヒト recombinant TNF が作製されるにいたり今後の臨床応用が期待されるのである。この TNF の作用の発現については、腫瘍細胞の表面にある TNF receptor を介して、IFN などと同様に endocytosis で細胞内に取り込まれる。細胞殺作用に receptor の媒介が必要なのは、microinjection により直接、細胞内に TNF を注入しても効果の現われないことから明らかである。TNF の target spectrum は種属を越えて存在し、マウスまたは家兎の TNF もヒト腫瘍細胞を障害する。また TNF は樹立培養細胞株に限らず、表 6 に示すように患者から得た生検材料にも感受性を示すが、一定の傾向はみられず、感受性の差を反映しているものといえよう。正常細胞には感受性を示していない。

in vivo における効果は皮下移植癌やヌードマウスに移植されたヒト悪性腫瘍についても報ぜられ、また腹水癌や転移腫瘍についてもその著明な抗腫瘍性作用が報告されている。このような *in vivo* の効果は *in vitro* の殺細胞効果だけで生ずるものか、宿主介在の免疫学的機作が関与するのか明らかではないが、TNF の直接的殺腫瘍細胞作用が著明なだけに、ヒト recombinant TNF は新しい抗癌剤として臨床応用が展開されるものといえよう。

IV. おわりに

悪性腫瘍と免疫という広範囲にわたる課題に対し、ヒトにおける抗腫瘍性 effector 機構をとくに非特異的な anomalous killer 細胞から解説し、さらに effector 細胞の産生する IL-2 産生能とその調節機構を検討し、最後に抗腫瘍性 cytokine による新しい癌治療を IL-2 による adoptive therapy, TNF とによる抗癌療法につき記載した。

文 献

- 1) 漆崎一朗：生体防御 基礎と臨床。7. がんに対する生体防御のしくみ。日本内科学会誌, 73: 1773~1778, 1984.
- 2) 漆崎一朗・石谷邦彦：疾患における免疫不全発現機序-癌。臨床免疫, 13: 989~998, 1981.
- 3) Hellström, I., Hellström, K.E., Pierce, G.E., et al.: Cellular and humoral immunity of different types of human neoplasms. Nature, 220: 1352~1354, 1968.
- 4) Halliday, W.J. Miller, S.: Leukocyte adherence inhibition. A simple test for cell-mediated tumor immunity and serum blocking factors. Int. J. Cancer, 9: 477~483, 1972.
- 5) 漆崎一朗：悪性腫瘍と免疫不全、癌と免疫不全。免疫と疾患, 6: 825~830, 1983.
- 6) Israel, L., Samac, R., Edelstein, R., et al.: *In vivo* nonspecific macrophage chemotaxis in cancer patients and its correlation with extent of disease, regional lymph node status, and disease-free survival. Cancer Res., 42: 2489~2494, 1982.
- 7) Pross, H.F., Barnes, M.G.: Natural killer

- cells in tumor-bearing patients. Natural cell-mediated immunity against cancer edited by Herberman, R.B. Acad. Press, p. 1063, 1980.
- 8) 漆崎一朗・新津洋司郎・石谷邦彦：消化管癌と免疫-NK 活性など。最新医学, 37 : 1186~1195, 1982.
 - 9) Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, M.Z., Rosenberg, S.A. : Lymphokine activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer resistant fresh solid tumors by interleukin 2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. J. Exp. Med., 155 : 1823~1841, 1982.
 - 10) Mazumber, A. Grimm, A., Rosenberg, S.A. : Characterization of the lysis of fresh human solid tumors by autologous lymphocytes activated in vitro with phytohemagglutinin. J. Immunol., 130 : 958~964, 1983.
 - 11) Aarden, L.A., et al. : Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors. J. Immunol., 123 : 2928~2929, 1979.
 - 12) Ihle, J.N. Robar, L., Keller, J., Lee, J.C., Hapel, A.J. : Interleukin 3 : Possible roles in regulation of lymphocyte differentiation and growth. Immunol. Rev., 63 : 5~32, 1982.
 - 13) Tanaka, N., Hashimoto, T., Matsui, T. Ono, M., Orita, K. : Natural cytotoxic reactivity of peripheral blood lymphocytes from digestive tract cancer patients against a colon cancer cell line and virus-infected Hela cells. Gann., 74 : 418~425, 1983.
 - 14) Takasugi, M., Ramseyer, A., Takasugi, J. : Decline of natural nonselective cell-mediated cytotoxicity in patients with tumor progression. Cancer Res., 37 : 413~418, 1977.
 - 15) Gillis, S., Watson, J. : Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an Interleukin 2-producing human leukemia T cell line. J. Exp. Med., 152 : 1709~1719, 1980.
 - 16) 高後 裕・笹川 裕・坂牧純夫・蟹沢裕司・秋山正晴・新津洋司郎・漆崎一朗：消化器癌患者の interleukin 2 産生能低下に関与する機構の解析。消化器と免疫, 12 : 23~26, 1984.
 - 17) Hardt, C. Röllinghoff, M. : Lyt-2, 3⁺ cyclophosphamide-sensitive T cells regulate the activity of an interleukin 2 inhibitor in vitro. J. Exp. Med., 154 : 262~274, 1981.
 - 18) Bonnard, G.D. : Long-term cultures of Immunocompetent T lymphocytes. The lymphocyte : 45~56, 1981.
 - 19) Chouaib, S., Fradelizi, D. : The mechanism of inhibition of human IL-2 production. J. Immunol., 129 : 2463~2468, 1982.
 - 20) Walker, C., Kristtensen, F., Betten, S.F., de Weck, A.L. : Lymphokine regulation of activated (G₁) lymphocytes. 1. prostaglandin E₂-induced inhibition of Interleukin 2 production. J. Immunol., 130 : 1770~1773, 1983.
 - 21) 小野寺義光：癌患者末梢血単核球の非特異的な細胞性免疫抑制作用に関する研究。札幌医誌, 50 : 113~126, 1981.
 - 22) Farrar, J.J., Benjamin, W.R., Hilfiker, M.L., Howard, M., Farrar, W.L. : The biochemistry, biology and role of interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. Immunol. Rev., 63 : 129~166, 1982.
 - 23) 漆崎一朗編：癌と BRM. サイエンスホーラム社, 1983.
 - 24) 漆崎一朗・高後 裕・渡辺直樹：BRM の話題, IL-2 と TNF を中心に。月刊薬事, 26 : 689~697, 1984.
 - 25) 新津洋司郎・高後 裕・渡辺直樹・漆崎一朗：生物学的活性物質による制癌療法。月刊薬事, 27 : 31~35, 1985.
 - 26) 布施 晃：インターフェロンの生物学的活性。免疫薬理, 1 : 89~94, 1983.
 - 27) 小川一誠・菅井紀子：インターフェロンの抗腫瘍効果—その現状と評価。免疫薬理, 1 : 25~31, 1983.
 - 28) Rinderknecht, E., Barbara, H., O'Connor, H. : Natural human interferon- γ . Complete amino acid sequence and determination of site of glycosylation. J. B. C., 259 : 6790~6797, 1984.
 - 29) Mazumder, A., Rosenberg, S.A. : Successful immunotherapy of natural killer-resistant established pulmonary melanoma metastases by the intravenous adoptive of syngenic lym-

- pocytes activated *in vitro* by interleukin 2. *Exp. Med.*, 159 : 495~507, 1984.
- 30) Pizza, G., Severini, G., Menniti, D., DeVinci, C., Corrado, F. : Tumor regression after intralesional injection of interleukin 2 in bladder cancer. Preliminary report. *Int. J. Cancer.*, 34 : 359~367, 1984.
 - 31) Lotze, M.T., France, L.W., Sharrow, S.O., Robb, R.Z., Roseuberg, S.A. : *In vivo* administration of purifier human inter-leukin 2. 1. Half-life and immunological effects. of *Immunol.*, 134 : 157~166, 1985.
 - 32) Granger, G.A., Kolb, W.P. : Lymphocyte *in vitro* cytotoxicity: Mechanisms of immune and nonimmune small lymphocyte mediated target L-cell destruction. *J. Immunol.*, 101 : 111~120, 1968.
 - 33) Tsoukas, C., Rosenan, W., Baxer, J.D. : Cellular receptors for lymphotoxin: Correlation of binding and cytotoxicity in sensitive and resistant target cells. *J. Immunol.*, 116 : 184~187, 1976.
 - 34) Carswell, E.A., Old, L.J. Kassel, R.L. Green, S., Flore, N., Williamson, B. : An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72 : 3666~3670, 1975.
 - 35) Matthews, N., Watkinson, J.F. : Tumor-necrosis factor from the rabbit. I. mode of action, specificity and physicochemical properties. *Brit. J. Cancer* : 302~309, 1978.
 - 36) 漆崎一朗・新津洋司郎・渡辺直樹 : BRM 研究の最近の進歩 1. 腫瘍壊死因子 *Progress in Medicine*, 4 : 663~674, 1984.
 - 37) 漆崎一朗・新津洋司郎・渡辺直樹 : TNF の定義と産生機序. 癌と化学療法, 11 : 1356~1368, 1984.
 - 38) 新津洋司郎・渡辺直樹・漆崎一朗 : Tumor necrosis factor. 免疫と血液, 6 : 417~424, 1984.
 - 39) 渡辺直樹・新津洋司郎・曾根久雄・根田 寛・石垣望夫・漆崎一朗 : Tumor necrosis factor による肺転移抑制効果について. 日本癌治療学会誌, 19 : 1049~1054, 1984.
-