臨 床

経動脈的養子免疫療法（LAK 療法）と放射線療法 を併用した口腔癌の4症例

湯 川 善 弘 笹 倉 裕 一 小 瀬 晃
篠 塚 和 明 松 本 剛 一 小 堀 実
伊 吹 千 夏 李 宇 錫 新 藤 潤 一
渡 辺 是 久*

要旨：この報告は lymphokine activated killer (LAK) 細胞を使った免疫療法と放射線療法の組み合わせにより治療した口腔癌の4症例について述べている。この研究では、われわれは誘導された LAK 細胞の表面フェノタイプと細胞障害活性を分析し、末梢血リンパ球（以下 PBL）もまた口腔癌患者に対して LAK 細胞投与前後で分析された。さらに、われわれは免疫組織化学的手法で抗腫瘍効果のあった部位の変化を観察した。

PBL は口腔癌患者より得、17~24日間の培養で rIL-2（塩野義製薬, 700JRU）と抗 CD3 moAb（25ng/ml）で LAK 細胞を誘導した。患者の腫瘍領域動脈への投与は2回の培養で得られた LAK 細胞を8回に分け、それぞれの投与の間隔は2~3日で $6.2 \sim 17 \times 10^9$ LAK 細胞がそれぞれの患者に投与された。細胞障害活性は4時間の ^{51}Cr 遊離試験法を行い、K-562細胞（E/T = 5/1）で測定された。フェノタイプの性格付けは2色の種々のモノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーにより測定された。この時測定された細胞は LAK 細胞と口腔癌患者への LAK 細胞投与前後の PBL であった。

結果は、細胞障害活性は LAK 細胞の平均で74.6%であった。LAK 細胞の投与前後の PBL の細胞障害活性は *in vitro* の測定で低下傾向を示した。フェノタイプの性格付けでは、LAK 細胞の平均で $\text{CD8}^+/\text{CD11}^-$ 細胞と $\text{CD3}^+/\text{HLA-DR}^+$ 細胞が増加した。LAK 細胞投与前後で PBL の平均では CD4^+ 細胞が増加し $\text{CD8}^+/\text{CD11}^-$ 細胞, $\text{CD3}^+/\text{HLA-DR}^+$ 細胞そして $\text{CD8}^+/\text{CD11}^+$ 細胞が減少していた。LAK 細胞投与後では、症例1において UCHL-1^+ 細胞と HLA-DR^+ 細胞が腫瘍周囲に著明に増加した。

キーワード：養子免疫療法, LAK 細胞, IL-2, 放射線療法,

緒 言

近年、悪性腫瘍の治療法の一つとして免疫療法が注目されている。特に悪性腫瘍患者の末梢血単核球（以下, PBMC）を interleukin-2（以下, IL-2）とともに培養し、得られた lymphokine

activated killer（以下, LAK）細胞を患者に移入し、抗腫瘍効果を期待した養子免疫療法についての研究が数多く行われてきた。

養子免疫療法では、高い抗腫瘍活性をもつエフェクター細胞を数多く腫瘍局所に集積させることがより高い治療効果に結びつくと考えられ、効果

神奈川歯科大学口腔外科学第一講座（主任：新藤潤一教授）

* 神奈川歯科大学口腔病理学教室（主任：渡辺是久教授）

〔1995年9月30日受付, 1996年4月16日受理〕

表 1 患者対象症例

症例	年齢	性別	部 位	組 織 診 断
1	84歳	男性	左側口底 (T3 N0 M0)	扁平上皮癌 (Grade II)
2	74歳	男性	左側下顎歯肉～中咽頭(T3 N0 M0)	扁平上皮癌 (Grade II)
3	71歳	女性	左側上顎歯肉 (r T4 N0 M0)	扁平上皮癌 (Grade II)
4	62歳	女性	右側上顎洞 (r T4 N0 M0)	腺様嚢胞癌 (Moderate)

的なエフェクター細胞の誘導と投与の方法が検討されている。エフェクター細胞の誘導法は、悪性腫瘍患者からリンパ球分離装置を用いて 1×10^9 個を超える PBMC を分離し、IL-2 とともに 5 日間の短期間の培養を行い、LAK 細胞を誘導する方法¹⁾と、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 個程度の PBMC に IL-2 と T 細胞 mitgen である抗 CD3 モノクローナル抗体 (以下、抗 CD3 抗体) を添加して 2 週間前後の長期培養を行い、LAK 細胞を得る方法²⁾の 2 種類がある。また、誘導された LAK 細胞の患者への移入経路については経静脈投与、選択的経動脈投与さらに腫瘍局所投与など³⁾が行われている。

今回われわれは、口腔癌患者から得た PBMC に IL-2 と抗 CD3 抗体を添加培養して LAK 細胞を誘導し、これを外頸動脈内に投与する養子免疫療法と放射線療法を併用して行い、誘導した LAK 細胞の表面抗原および患者末梢血リンパ球の LAK 細胞投与前後における表面抗原の変化を検索した。さらに、LAK 細胞投与前後の腫瘍浸潤細胞の免疫組織学的観察も併せて行った。

対象および方法

1. 対象

対象症例は1986年2月～1990年4月までに神奈川歯科大学口腔外科を受診した口腔癌患者で、外科的治療の困難な4症例である。

症例1は口底部扁平上皮癌、症例2は下顎歯肉～中咽頭部扁平上皮癌、症例3は上顎歯肉部扁平上皮癌、症例4は上顎洞部腺様嚢胞癌であり、症例1および症例2が一次症例、症例3および症例4が再発症例であった (表1)。

2. 治療スケジュール

これら4症例に対し、LAK細胞と rIL-2 投与

による養子免疫療法と放射線療法とを組み合わせ、異時あるいは同時併用治療を行った。

LAK 細胞はあらかじめ上甲状腺動脈あるいは浅側頭動脈より外頸動脈内に留置したカニューレより投与した。LAK 細胞の1回投与量は $0.8 \sim 2.2 \times 10^9$ 個/20ml で、約30分かけてカニューレより動脈内投与を行った。各症例とも細胞投与4回を1クール (8～16日間) として計2クール行い、各クールの間隔は3日～40日であった。総投与細胞数は症例1で 1.7×10^{10} 、症例2で 6.2×10^9 、症例3で 6.5×10^9 、症例4で 6.4×10^9 個であった。

放射線治療との併用状況は、症例1は ^{60}Co 外部照射 (左右対向2門、2 Gy/日、総線量60Gy) 期間中、上甲状腺動脈に留置したカニューレより LAK 細胞と IL-2 投与を行い、これを1クール目とした。2クール目は ^{226}Ra 組織内照射 (34 Gy) と同時併用した。

症例2の LAK 細胞と rIL-2 の投与は2クールとも ^{60}Co 外部照射 (左右対向2門、2 Gy/日、総線量60Gy) と ^{226}Ra 組織内照射 (54Gy) による放射線治療期間後に行った。

症例3では LAK 細胞と rIL-2 の投与は2クールとも ^{60}Co 外部照射 (直交2門、2 Gy/日、総線量34Gy) 治療期間後に行った。

症例4では LAK 細胞と rIL-2 の投与は1クール目を ^{60}Co 外部照射 (直交2門、2 Gy/日、総線量50Gy) による放射線治療期間前に、さらに2クール目を放射線治療期間中から期間後にかけて行った (表2-a、表2-b)。

3. LAK 細胞の誘導

PBMC は患者末梢静脈より約50ml 採血し、比重遠心分離法で行った。

培地は genetical recombinant interleukin-2 (以下、rIL-2 ; これはヒト脾臓リンパ球の m-

表 2-a 各症例の治療

症 例	本療法施行前の治療	養子免疫療法と放射線療法の治療プロトコール
1	—	<p>1989年 6月</p> <p>↑ 初診</p> <p>△ 左右対向2門2 Gy/日</p> <p>⁶⁰Co照射</p> <p>7月 ▼▼▼ 8月 ▼▼▼ 9月 ▼▼▼ 10月 ▼▼▼ 11月 ▼</p> <p>LAK細胞+rIL-2投与 </p> <p>LAK細胞+rIL-2投与 </p> <p>226 Ra組織内照射 34 Gy</p>
2	—	<p>1989年 6月</p> <p>↑ 初診</p> <p>△ 左右対向2門2 Gy/日</p> <p>⁶⁰Co照射</p> <p>7月 ▼▼▼ 10月 ▼▼▼ 11月 ▼▼▼ 12月 ▼▼▼</p> <p>LAK細胞+rIL-2投与 </p> <p>LAK細胞+rIL-2投与 </p> <p>226 Ra組織内照射 54 Gy</p>
3	<p>初診1989年5月9日</p> <p>⁶⁰Co照射34Gy</p> <p>5-Fu局所重投1875mg</p> <p>手術・腫瘍摘出術</p> <p>・患側全顎舌咽青術</p> <p>⁶⁰Co照射30Gy</p> <p>以後経過観察</p>	<p>1989年 12月</p> <p>↑ 再発</p> <p>△ 直交2門2 Gy/日</p> <p>⁶⁰Co照射</p> <p>1月 ▼▼▼ 3月 ▼▼▼ 4月 ▼▼▼</p> <p>LAK細胞+rIL-2投与 </p> <p>LAK細胞+rIL-2投与 </p> <p>5月 ▼▼▼ 6月 ▼</p>
4	<p>初診1986年2月4日</p> <p>⁶⁰Co照射18Gy</p> <p>手術・腫瘍摘出術</p> <p>・患側頰舌球摘出術</p> <p>以後経過観察</p>	<p>1989年 11月</p> <p>↑ 再発</p> <p>△ 直交2門2 Gy/日</p> <p>⁶⁰Co照射</p> <p>12月 ▼▼▼ 1月 ▼▼▼ 2月 ▼▼▼ 3月 ▼▼▼ 4月 ▼</p> <p>LAK細胞+rIL-2投与 </p> <p>LAK細胞+rIL-2投与 </p> <p>50 Gy</p>

表 2-b 治療および治療成績

症例	LAK 細胞総投与数	rIL-2 総投与量	放射線量	効果判定	生存期間
1	1.7×10 ¹⁰ 個	2.8×10 ⁶ JRU	⁶⁰ Co 60Gy ²²⁶ Ra 34Gy	C R	8 か月 他病死
2	6.2×10 ⁹ 個	2.8×10 ⁶ JRU	⁶⁰ Co 60Gy ²²⁶ Ra 50Gy	P R	7 か月 腫瘍死
3	6.5×10 ⁹ 個	2.8×10 ⁶ JRU	⁶⁰ Co 34Gy	N C	4 か月 腫瘍死
4	6.4×10 ⁹ 個	2.8×10 ⁶ JRU	⁶⁰ Co 50Gy	P R	4 年 9 か月 腫瘍死

RNA に由来する134個のアミノ酸残基, 分子量 15, 547.24からなるタンパク質で塩野義製薬より供給された) 700 Japan Reference Unit (以下, JRU)/ml と, 抗 CD 3 抗体25ng/ml および非働化 (HI) AB 型血清 5 % を添加した Hymedium 910を開始メディウムとし, rIL-2 700 JRU/ml と非働化处理した患者と同血液型の新鮮凍結血漿 (HIFFP) 10%を添加した Hymedium 910を維持メディウムとした。

採取した PBMC はフラスコ内に細胞密度が 1 ~ 2 × 10⁶個/ml になるように開始メディウムに浮遊させ, 37°C, 湿度95%, 5 % CO₂ の条件下にフラスコ内で約10日間の培養を行い, 続いて培養細胞浮遊液をガス透過性バッグ(KCF 3000A : 川澄科学) に移し替え, 細胞の回収終了まで培養を行った。培養期間中は細胞密度が 1 ~ 2 × 10⁶ 個/ml になるように維持メディウムを追加し, LAK 細胞の誘導を行った (図 1)。

4. LAK 細胞の回収

ガス透過性バッグでの培養 7 日目から 2 ~ 4 日ごとに約1.0~1.5×10⁹個の LAK 細胞を回収した。回収後のバッグ内には細胞密度が 1 × 10⁶個/ml になるように維持メディウムを追加し, 培養を継続した。同様の操作をさらに 3 回くり返し, 4 回目にバッグ内の細胞をすべて回収した。回収された LAK 細胞をヒト血清アルブミン 1 % 添加生理食塩水で 2 回, ヒト血清アルブミン 2 % 添加生理食塩水で 1 回, 計 3 回洗浄した後, rIL-2 (35×10⁴ JRU) を含むヒト血清アルブミン 5 % 添加生理食塩水約20ml に浮遊させた (図 1)。

5. 細胞障害活性の測定

PBMC

図 1 LAK 細胞誘導法

誘導された LAK 細胞の細胞障害活性は各症例において各投与前の細胞を用いて計 8 回 ⁵¹Cr 遊離試験法で細胞障害活性を測定した。また, 各クールでの LAK 細胞投与直前 および 投与 1 時間後の各 8 回, 合計16回の患者 PBMC についても同様の測定を行った。

標的細胞としては10% FCS 添加 RPMI 1640 で継代維持された natural killer (以下, NK) 感受性細胞株K-562 (慢性骨髄性白血病由来) を用いた。

エフェクター細胞としては LAK 細胞投与直

前および投与 1 時間後に比重遠心分離により得た患者 PBMC と、回収した LAK 細胞を用いた。

^{51}Cr 遊離試験法は標的細胞を 1×10^6 個/100 μl に調整後、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_2$ 溶液を 100 μCi 加え、37°C、60 分間 標 識 後 1×10^5 個/ml に 10% FCS 添加 RPMI 1640 に浮遊させ、96 well の U 底マルチプレートに 100 μl ずつ分注した。エフェクター細胞は 5×10^5 個/ml に 10% FCS 添加 RPMI 1640 に浮遊させ、100 μl ずつ各標的細胞に添加してエフェクター細胞数/標的細胞数比 (以下、E/T 比) 5/1 とし、500rpm で 5 分間遠心後、37°C、湿度 95%、5% CO_2 の条件下にて 4 時間反応させた。反応終了後、さらに 500rpm で 5 分間遠心し、培養上清 100 μl 採取し、その放射活性をガンマーシンチレーションカウンターで測定した。標識標的細胞 1×10^4 個/100 μl に 1 N の塩酸 100 μl と 10% FCS 添加 RPMI 1640 100 μl をそれぞれ添加し、最大遊離と自然遊離とし以下の式から各エフェクター細胞の細胞障害活性を算出した。

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

6. 細胞表面フェノタイプの解析

LAK 細胞と LAK 細胞投与直前および投与 1 時間後の患者 PBMC についてそれぞれの細胞表面フェノタイプの解析をフローサイトメトリー (Spectrum III : Becton Dickinson) を用いてモノクローナル抗体による two color 法にて検索した。誘導された LAK 細胞の表面フェノタイプの測定は、各症例において各投与前の細胞を用いて計 8 回測定した。また、各クールでの LAK 細胞投与直前および投与 1 時間後の各 8 回、合計 16 回の患者 PBMC についても同様の測定を行った。モノクローナル抗体は CD25 (IL-2R), CD8 (Leu2a), CD11 (Leu15), CD4 (Leu3a), Leu8, CD57 (Leu7), CD16 (Leu11), CD3 (Leu4), HLA-DR および CD56 (Leu19) を用い、組み合わせは CD8/CD11, CD4/Leu8, CD57/CD16, CD3/HLA-DR, および CD16/CD56 を用いた。

7. 病理組織染色

4 症例とも初診時、LAK 細胞投与時および投与 1 か月後に局所麻酔下で採取した腫瘍組織を 2 分割し、その 1 片は 10%ホルマリン緩衝液にて固

定し hematoxylin-eosin (H-E) 染色を行った。また 1 片は OTC コンパンドにて急速凍結し、クライオスタットで 2 μm に薄切し、avidin-biotin-peroxidase complex 法により免疫組織化学的染色を行った。モノクローナル抗体は UCHL-1 と Histoclon-LN-3 を用いた。

結 果

1. 細胞障害活性

LAK 細胞の細胞障害活性は 74.6% と LAK 細胞投与前の患者 PBMC の細胞障害活性 23.3% に比べ 3.2 倍に増強されていた。また、LAK 細胞投与後の患者 PBMC の細胞障害活性は 17.7% で投与前に比べ 0.76 倍に減少が認められた (表 3)。

2. 細胞表面フェノタイプの測定

LAK 細胞の CD25 の陽性率は 3.9% で投与前患者 PBMC の 1.9% に比べ 2.1 倍であった。CD8 $^+$ /CD11 $^-$ 細胞は LAK 細胞では 46.9% で投与前患者 PBMC の 24.6% に比べ 1.9 倍であった。CD3 $^+$ /HLA-DR $^+$ 細胞は 62.4% で投与前患者 PBMC の 19.8% に比べ 3.2 倍であった。また、CD8 $^+$ /CD11 $^+$ 細胞は 13.3% で投与前患者 PBMC の 1.3 倍、CD4 $^+$ /Leu8 $^-$ 細胞は 26.9% で投与前患者 PBMC の 2.1 倍であった。CD57 $^+$ /CD16 $^+$ 細胞は 2.6% で投与前患者 PBMC の 0.15 倍、CD3 $^+$ /HLA-DR $^-$ 細胞は 14.4% で投与前 PBMC の 0.38 倍であった (表 3)。

LAK 細胞投与前後における患者 PBMC のフェノタイプの変化は CD25 陽性細胞は 1.9% から 4.4% に 2.32 倍の増加が認められた。また CD4 $^+$ 細胞群で細胞投与後の陽性率増加が認められた。しかし、LAK 細胞で高値を示した CD8 $^+$ /CD11 $^-$ 細胞は細胞投与前後で 24.6% から 11.6% に、CD3 $^+$ /HLA-DR $^+$ 細胞は 21.5% から 13.3% に、CD8 $^+$ /CD11 $^+$ 細胞は 10.0% から 2.1% にそれぞれ減少し、さらに CD57 $^+$, CD16 $^+$, CD56 $^+$ 細胞群の陽性率の減少が認められた (表 3)。

3. 病理組織学的変化

症例 1 について、初診時生検材料の H-E 染色では腫瘍周囲に単核細胞の浸潤が認められ (写真 1-A), これらの細胞は免疫組織染色では UCHL-1 陽性細胞 (T 細胞) が少数みられたが (写真 1-B), Histoclon-LN-3 陽性細胞 (HLADR

表 3 LAK 細胞および LAK 細胞投与前後の患者末梢血リンパ球の細胞障害活性と表面フェノタイプ (n=4)

	LAK 細胞 (%)	投与前 PBMC (%)	投与後 PBMC (%)	投与後/前
細胞障害活性	74.6±28.6	23.3±25.0	17.7±17.8	0.76
CD25	3.9± 5.6	1.9± 2.67	4.4± 2.9	2.32
CD8- /11-	27.2± 9.8	43.7±12.7	75.2±13.9	1.72
CD8+ /11-	46.9±14.5	24.6± 7.2	11.6± 5.3	0.47
CD8+ /11+	13.3± 8.8	10.0± 4.5	2.1± 2.3	0.21
CD8- /11+	15.9±10.1	21.7± 7.2	11.7± 7.4	0.54
CD4- /Leu8-	71.4± 8.5	55.4±14.1	28.4±20.7	0.51
CD4+ /Leu8-	26.9± 8.5	12.9± 4.4	20.3± 7.5	1.57
CD4+ /Leu8+	1.0± 1.4	17.5±12.4	39.0±18.3	2.23
CD4- /Leu8+	0.7± 1.0	14.2± 4.9	12.3± 3.8	0.87
CD57- /16-	55.2±12.8	56.0±14.3	85.9±20.6	1.53
CD57+ /16-	34.9±12.8	23.8± 9.8	7.9±10.0	0.33
CD57+ /16+	2.6± 2.1	16.8± 8.7	4.4± 8.3	0.26
CD57- /16+	6.7± 7.1	3.4± 2.0	1.8± 2.6	0.53
CD3- /HLA-DR-	5.1± 3.3	30.7±13.7	15.3±10.2	0.50
CD3+ /HLA-DR-	14.4± 9.3	38.4±16.1	58.5±18.8	1.52
CD3+ /HLA-DR+	62.4±17.1	19.8± 7.7	13.3± 6.3	0.67
CD3- /HLA-DR+	18.6±11.2	11.1± 7.1	12.9± 8.5	1.16
CD16- /56-	79.2±11.7	67.2±11.1	89.8±14.6	1.34
CD16+ /56-	1.0± 1.1	9.9±12.7	6.2±13.7	0.63
CD16+ /56+	6.9± 5.6	17.1±11.6	1.6± 2.7	0.09
CD16- /56+	12.9± 7.4	5.8± 4.6	2.3± 2.5	0.40

陽性細胞)はほとんど見られなかった。

LAK 細胞 1 クール投与後では、腫瘍周囲に浸潤している単核細胞の多くは UCHL-1 陽性細胞で(写真 2-A)、Histoclone-LN-3 陽性細胞は初診時に比べ、細胞数の増加が見られた(写真 2-B)症例 2, 3 および 4 においては、初診時の腫瘍組織、LAK 細胞投与時および投与 1 か月後の腫瘍該当部組織の生検材料の間に H・E 染色では腫瘍浸潤リンパ球数の増加を認めず、UCHL-1 陽性細胞あるいは Histoclone-LN-3 陽性細胞の占有率にもほとんど変化を認めなかった。

4. 治療効果および副作用

治療効果の判定は、養子免疫療法および放射線療法終了後 1 か月後に、頭頸部がん治療効果判定基準⁴⁾に基づいて行った。症例 1 は CR と判定した。治療後の生検において腫瘍細胞の残存は確認されなかった。症例 2, 症例 4 では腫瘍直径の 50 %以上の縮小が認められ PR と判定した。症例 3

については NC であった。

副作用は軽度の発熱と、赤血球数の軽度の減少が認められたのみであった。

考 察

養子免疫療法は LAK 細胞の in vitro での細胞障害活性を生体内に移してその効果を期待した治療法である。Rosenberg^{1,5)} らによって有効例が報告され、その後多くの施設でその有効性が検討され腎細胞癌、悪性黒色腫および大腸癌に抗腫瘍効果が認められた⁶⁾。また頭頸部癌では猪川ら⁷⁾が良好な結果を報告している。

現在大量の LAK 細胞を誘導するためにはリンパ球分離装置を利用して患者から大量のリンパ球を採取し、LAK 細胞を誘導する方法¹⁾と少量の患者 PBMC から抗 CD3 抗体を用い、比較的長期間培養して LAK 細胞を得る方法²⁾の 2 つが一般的である。しかし前者では比較的抗腫瘍活性

写真 1 初診時病理組織所見(症例1)

A : H・E 染色 (×50)

B : UCHL-1 モノクローナル抗体による免疫組織化学染色 (×80)

の高い LAK 細胞が大量に得られるが、リンパ球分離に高価で大がかりな装置が必要となる。これに対し、後者では特別な装置を必要とせず、少量の患者 PBMC から大量の LAK 細胞が得られるが、培養期間が長期になり細胞数を増加させると得られる LAK 細胞の単位細胞あたりの細胞障害活性が低下するという報告⁸⁾がある。

本報告では比較的簡便な後者の方法を選択し、関根らの方法²⁾に準じ、患者 PBMC を700JRU/ml の IL-2 と25ng/ml の抗 CD 3 抗体とともに17～26 日間培養する方法を採った。伊吹⁹⁾は抗 CD 3 抗体を用いて誘導された LAK 細胞について解析し、培養5日目頃から細胞数は対数的な増加を示すが、細胞1個あたりの細胞障害活性は5日をピークに減少を示すことを報告している。この細胞増殖と細胞障害活性の低下は養子免疫療法を行ううえで重要な問題である。誘導されたエフェクター細胞の抗腫瘍活性を細胞1個あたりの細胞障害活性×細胞数として評価するならば、抗 CD 3 抗体を用いた LAK 細胞の誘導では培養期間

写真 2 LAK 細胞投与後の病理組織所見(症例1)

A : UCHL-1 モノクローナル抗体による免疫組織化学染色 (×60)

多数の UCHL-1 陽性細胞を認める。

B : Histoclon-LN-3 モノクローナル抗体による免疫組織化学染色 (×60)

Histoclon-LN-3 陽性細胞の浸潤がみられる。

を長期にすることが有効と考えられる。しかし誘導時に増加するエフェクター細胞群でその主体は CD8⁺ 細胞であり、この群の細胞は CD8⁻ 細胞に比べ抗腫瘍活性が低く⁹⁾、エフェクター細胞個々の抗腫瘍活性を考えた場合、細胞数を増加させるためだけの長期培養は有意義とは考えられない。われわれの経験では2～3週程度の培養期間が妥当と考えられ、関根ら^{2,10,11)}も2週間の培養で良好な結果を報告している。

養子免疫療法の効果を高めるためには高い抗腫瘍活性をもったエフェクター細胞を数多く誘導するとともに、効率よく腫瘍局所に到達させることが重要と考えられ、LAK 細胞を腫瘍の栄養動脈内に選択的に投与する方法¹²⁻¹⁴⁾が妥当であろう。静脈経路で全身投与された LAK 細胞は、早期か

ら肺、肝臓等に強い集積性があることが動物実験^{3,15,16)}や患者体内分布測定¹⁷⁾から確認されており、口腔領域への集積の可能性は低いと考えられる。経静脈以外の投与法で肝癌、腎癌、肺転移および肝転移癌などは動脈内投与¹²⁻¹⁴⁾、また癌性胸膜炎や腹膜炎の場合には胸膜腔内および腹腔内への投与¹⁸⁾、表在性腫瘍に対しては腫瘍内投与¹⁹⁾も行われている。本報告での治療はあらかじめ腫瘍栄養動脈を確保し選択的な動脈内投与を行った。LAK細胞の動脈内投与における腫瘍局所および全身でのLAK細胞の詳細な分布状態や代謝については明らかではないが、猪川ら⁷⁾は上顎癌に対して浅側頭動脈経由で顎動脈分岐部にカニューレーションを行い、¹¹¹In-oxineで標識したキラー細胞を投与してその体内動態を観察しており、投与後48時間でも上顎に放射活性の残存が認められたとしている。本報告でも、症例1の病理組織学的な検索では腫瘍部において活性化したT細胞を含むと考えられるUCHL-1陽性細胞の集積が観察されている。しかし、投与したLAK細胞中で増加していたポピュレーション(CD8⁺/11⁻, CD8⁺/11⁺, CD57⁺/16⁻, CD3⁺/HLA-DR⁺)が投与後末梢血中で増加せず、LAK細胞投与後の末梢血中に増加したポピュレーションはCD25⁺, CD8⁻/11⁻, CD4⁺/Leu8⁻, CD4⁺/Leu8⁺, CD57⁻/16⁻, CD3⁺/HLA-DR⁻, CD3⁻/HLA-DR⁺, CD16⁻/56⁻であり、そのまま末梢血中に反映していなかった。CD25⁺については、もともと末梢血中にはごくわずかしかな存在しないのでLAK細胞投与後末梢血中に大幅に増加するのは理解できるが、その他のフェノタイプのこのような動きについてはわれわれの理解を越えている。今回の症例ではIL-2で誘導されたLAK細胞とLAK細胞投与前後の患者PBMCの細胞障害活性を測定する際、NK感受性のK-562細胞とLAK感受性のDaudi細胞の2種類の標的細胞を用いたがLAK細胞投与前後の患者PBMCのLAK活性は各症例でLAK細胞投与毎にまちまちでNK活性のように一定の傾向を示さなかった。したがって、今回はDaudi細胞に対する細胞障害活性は評価の対象としなかった。その結果患者PBMCの細胞障害活性は、LAK細胞の投与前後で上昇が認められなかった(表3)。これらのこ

とからLAK細胞の多くが投与直後に末梢血以外に集積された可能性も考えられる。

副作用については臨床症状としては発熱、悪寒、悪心、嘔吐、下痢、発疹など臨床検査的には赤血球数、血小板、血清アルブミンの低下や好酸球、血清ビリルビン、血清クレアチニンの増加などが報告されており^{20,21)}、またIL-2大量投与では肺血管障害に基づくvascular leak syndrome (VLS)²²⁾が問題となっている。今回の症例では初回LAK細胞投与により、発熱が認められたがこれは事前にインドメタシン坐薬を使用して容易にコントロールできた。その他の症状は認められなかった。また臨床検査では軽度の赤血球数の低下がみられた以外、大きな変化の見られた項目はなかった。

治療効果については、Rosenbergら^{1,5)}の行った養子免疫療法では、腎細胞癌で33%、悪性黒色腫で23%の奏効率が得られたと報告されている。わが国では田口ら、高久らがrIL-2量およびLAK細胞数ともRosenbergらの1/10以下の規模で行っているが、不満足な成績にとどまっている⁶⁾。しかし頭頸部領域では、石川ら^{7,23)}が上顎癌に対し経動脈的LAK細胞投与で13例中9例に抗腫瘍効果があったとし、養子免疫療法の有益性を報告している。一方、放射線療法が腫瘍免疫に与える影響としては、佐藤ら²⁴⁾は放射線治療中の腫瘍内に浸潤するリンパ球はT細胞が優位を占め、かつhelper/inducer T細胞がsuppressor/cytotoxic T細胞よりも優位を占めているとしている。また小川ら²⁵⁾は放射線照射時に腫瘍細胞上のHLA抗原の発現量の増加が起こり抗原認識がされやすい状態になると報告しているが、自己腫瘍細胞の被認識性の変化については今後の数多くの研究を待たねばならない。

今回の症例については高年齢であること、4例中2例は再発症例であることなどで、外科的治療の困難な症例であったことからこの治療が選択されたが、症例1の治療効果はT3症例にもかかわらずCRで、術後生検でも腫瘍細胞の消失が認められ良好な結果が得られた。症例4では、初診時原発巣に対し術前照射として18Gyの⁶⁰Co外部照射を行ったが腫瘍の増殖速度は全く衰えずPDを示し、放射線治療に対し著しい抵抗性を示

した。しかしながら手術後再発を認めた1989年11月から本療法を開始したところ、腫瘍の増殖は認められずPRを示し、さらに4年9か月の延命を認めた。このことは本療法が放射線治療のみでは抵抗性を示す腫瘍に対し有効である可能性を示している。今回の4症例では放射線治療に伴い経動脈的にLAK細胞の投与を行ったが、このうち3例に臨床的抗腫瘍効果が認められた。加地ら²⁶⁾は頭頸部癌に対し経動脈的LAK細胞投与と、放射線治療との併用で全例抗腫瘍効果が得られたと報告しており腫瘍免疫の面からも放射線療法と養子免疫療法との組み合わせは、今後癌治療の一選択肢として考慮すべき治療法になり得るかもしれない。また、高齢患者の増加が予想され、積極的な治療が選択できない場合や患者の quality of life の改善を考えるうえで本治療は有用な方法であると考えられた。また、最近では術後の補助療法としても養子免疫療法が提唱され始められてきている^{27,28)}。しかし、一方で加齢に伴い生体の免疫力が低下し、また再発症例などでも患者の免疫力が低下していると考えられ、細胞障害活性の高いLAK細胞を大量に得ることが難しくなることが予想され、これを補う新たな培養法や放射線療法のほかに Biological Response Modifiers (BRM) や化学療法の併用により免疫賦活や抗腫瘍効果の増強が今後考えるべき課題であろう。

結 語

われわれは口腔癌患者4症例に対し、患者から得たPBMCにIL-2と抗CD3抗体を添加培養し、誘導したLAK細胞を経動脈的に局所投与する養子免疫療法と放射線療法を併用した。誘導したLAK細胞とLAK細胞投与前後の患者PBMCの細胞障害活性および表面抗原の変化を検索し、LAK細胞投与前後の腫瘍浸潤細胞を免疫組織学的に観察した。

4症例中3例に抗腫瘍効果が認められ、重篤な副作用はみられなかった。

本論文の要旨は、第35回日本口腔外科学会総会(1990年10月、岡山)および第25回神奈川歯科大学学会総会(1990年12月、横須賀市)において発表した。

文 献

- 1) Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., et al.: Observation on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 313: 1485-1492, 1985.
- 2) 関根暉彬, 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.
- 3) 細川真登男, 河田 聡: LAK細胞の腫瘍組織集積性の増強. 細川真登男: 癌の養子免疫療法, オンコロギア社, 東京, 1990, 51-58.
- 4) 広戸幾一郎, 竹田千里, 他: 頭頸部がん治療効果判定効果基準(案). 日本頭頸部腫瘍学会治療効果判定基準委員会編, 1982, 1-2.
- 5) Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., et al.: A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 316: 889-897, 1987.
- 6) 高後 裕, 坂牧純夫, 他: IL-2-LAK療法の臨床効果の解析. 細川真登男: 癌の養子免疫療法, オンコロギア社, 東京, 1990, 71-78.
- 7) 猪川 勉, 江島正郎, 他: 自己あるいは同種癌細胞刺激により誘導された活性化リンパ球の動注法による頭頸部癌養子免疫療法. *癌と化学療法* 16: 1438-1447, 1989.
- 8) 田中利茂, 木本安彦, 他: LAK細胞増殖および細胞障害活性に対する抗T3(CD3)モノクローナル抗体OKT-3の影響(phenotypeからの検討). *BIOThERAPY* 2: 715-720, 1988.
- 9) 伊吹千夏: 抗CD3抗体添加rIL-2誘導LAK細胞の抗腫瘍活性に関する研究. *日口外誌* 39: 1191-1205, 1993.
- 10) 関根暉彬: 固層化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.
- 11) 白岩浩志, 関根暉彬, 他: 固層化CD3抗体およびインターロイキン2によるリンパ球活性化の基礎的検討. *BIOThERAPY* 4: 427-433, 1990.
- 12) 井廻道夫, 森山貴史, 他: LAK療法. *肝胆膵* 15: 583-590, 1987.
- 13) 高山孝弘, 峠 哲哉, 他: 血漿交換療法併用によるLAK細胞養子免疫療法の臨床効果. *BIOThERAPY* 3: 183-187, 1989.
- 14) 早川直道, 増田 毅, 他: 進行性腎癌に対するLAK細胞の動注療法とその効果について. *日本泌尿器科学会雑誌* 80(1): 28-34, 1989.
- 15) Lotze, M.T., Line, B.R., et al.: The *in vitro* distribution of autologous human and murine lymphoid cells grown in T cell grown factor (TCGF): implications for the adoptive immunotherapy of tumors. *J. Immunol.* 125: 1487-1493, 1980.
- 16) 漆崎一郎: 養子免疫療法 サイトカインと癌治療.

- ライフサイエンス, 東京, 1993, 108-139.
- 17) 高橋雄三, 森 良之, 他: 口腔癌患者に対する養子免疫療法— LAK 細胞の腫瘍組織への集積性および体内分布動態の検索— (抄) 日口誌 39: 1270-1271, 1990.
 - 18) Komada, M., Sakamoto, Y., et al.: Treatment of malignant ascites with allogeneic and autologous lymphokine-activated killer cells. *Gynecol-Oncol* 34: 34-37, 1989.
 - 19) Adler, A., Stein, J.A., et al.: Intralesional injection of interleukin-2-expanded autologous lymphocytes in melanoma and breast cancer patients. *J Biol Response Med.* 3: 491-500, 1984.
 - 20) 小倉 剛: リンフォカインの臨床応用とその問題点. 代謝 26: 135-141, 1989.
 - 21) 高久史磨: S-6820 (遺伝子組換えヒトインターロイキン2) の臨床第Ⅱ相試験. *BIOOTHERAPY* 3: 796-805, 1989.
 - 22) 水野和人, 楊河宏章, 他: IL-2/LAK 治療に伴う vascular leak syndrome (VLS) の発症機構. 臨床免疫 23: 597-601, 1991.
 - 23) 石川 孝, 猪川 勉, 他: 自己あるいは同種癌および rIL-2 刺激誘導キラー細胞の臨床応用. 細川真登男: 癌の養子免疫療法. オンコロジヤ社, 東京, 1990, 85-90.
 - 24) 佐藤雄一: 浸潤リンパ球, 組織球のサブセット同定による肺癌局所の免疫応答の検討. 病理と臨床 3: 241-248, 1975.
 - 25) 小川恭弘: 癌の放射線治療の免疫応答. *BIOOTHERAPY* 4: 1246-1255, 1990.
 - 26) 加地亮詞, 岡本正人, 他: 頭頸部癌に対する局所養子免疫療法と放射線治療との併用療法. 日口外誌 36: 1720-1729, 1990.
 - 27) 石原和之, 山崎直也, 他: 皮膚悪性腫瘍に対する養子免疫療法. 第3回 JBRM 学会公開シンポジウム抄録集 28, 1994.
 - 28) Osbam, M., Lavin, P. et al.: Effect of autolympocyte therapy on survival and quality of life in patients with metastatic renal-cell. *Lancet* 335: 994-998, 1990.

Four cases of oral cancer treated with adoptive immunotherapy (LAK therapy) and radiotherapy

Yoshihiro Yugawa, Yuuichi Sasakura, Akira Kose, Kazuaki Shinozuka,
Gouichi Matsumoto, Minoru Kobori, Chinatsu Ibuki,
Ushaku Lee, Junichi Shindo and Yoshihisa Watanabe*

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Kanagawa Dental College
(Chief: Prof. Junichi Shindo)

* Department of Oral Pathology, Kanagawa Dental College
(Chief: Prof. Yoshihisa Watanabe)

Abstract

This report describes four cases of oral cancer treated with immunotherapy using lymphokine activated killer (LAK) cells and radiotherapy. In this study, the cytotoxicity and surface phenotype of induced LAK cells were analyzed. Peripheral blood lymphocytes (PBLs) were also analyzed before and after LAK cell infusion into oral cancer patients. Furthermore, the change of the affected part of the tumor using immunohistochemical procedure was observed.

PBLs were obtained from oral cancer patients and induced to LAK cells by rIL-2 (Shionogi Pharmaceutical Co, Ltd, 700JRU/ml) and anti-CD3 mAb (25ng/ml) by culturing for 17 to 24 days. Infusions into regional artery of the tumor in patients were 8-fold divided LAK cells obtained by culturing twice, each infusion interval was 2 to 3 days, and $6.2 \sim 17 \times 10^9$ LAK cells were infused into each patient. The cytotoxicity was determined in a 4-hour ^{51}Cr release assay and was determined by K-562 cells (E/T = 5/1). Phenotypic characterization was determined by dichromatic flow cytometry using several monoclonal antibodies. The determined cells were LAK cells and PBLs before and after infusion of LAK cells into oral cancer patients.

As for results, cytotoxicity of the mean of LAK cells was 74.6%. Cytotoxicity of PBLs between before and after infusion of LAK cells showed the tendency to decrease in *in vitro* determination. As for phenotypic characterization, $\text{CD8}^+/\text{CD11}^-$ cells and $\text{CD3}^+/\text{HLA-DR}^+$ cells were increased with the mean of LAK cells. CD4^+ cells were increased, $\text{CD8}^+/\text{CD11}^-$ cells, $\text{CD3}^+/\text{HLA-DR}^+$ cells, and $\text{CD8}^+/\text{CD11}^+$ were decreased with the mean of PBLs between before and after infusion of LAK cells. After infusion of LAK cells, infiltration of UCHL-1^+ cells and HLA-DR^+ cells were increased markedly around the tumor in case 1.

Key words: adoptive immunotherapy, lymphokine activated killer cell, Interleukin-2, radiotherapy

Requests for reprints to: Dr. Yugawa Y., First Department of Oral and Maxillo-Facial Surgery, Kanagawa Dental College, 82 Inaoka-cho Yokosuka City, Kanagawa, 238 Japan