原 著

活性化リンパ球療法を実施した腫瘍罹患犬 10 例

星野有希¹⁾ 高木 哲¹⁾ 大崎智弘²⁾ 奥村正裕^{1)†} 藤永 徹¹⁾

1) 北海道大学大学院獣医学研究科 (〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目)

2) 北海道大学附属動物病院 (〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目)

(2008年2月12日受付・2008年10月9日受理)

要 約

悪性腫瘍罹患犬10症例に対して活性化リンパ球療法を実施した。症例犬より採取した末梢血単核球を抗CD3抗体およびヒトリコンビナントIL-2を用いて14日間培養後、ヒトリコンビナントIFN- α を感作した細胞を活性化リンパ球とし、当該症例に複数回投与した。その結果、すべての症例で末梢血単核球細胞の構成細胞比が変化し、うち2症例で血清IFN- γ 濃度の上昇が認められた。また活性化リンパ球の投与による副作用は認められず、症例の生活の質を十分維持することが可能であった。以上のことから、本治療は腫瘍の発症およびその治療により生活の質が低下しがちな犬に対しても免疫応答を活性化することが可能であり、腫瘍の成長および転移に対する免疫学的防御能を活性化させる治療法として十分適用可能であると考えられた。——キーワード：活性化リンパ球、抗CD3抗体、犬、IL-2。

----- 日獣会誌 62, 383～387 (2009)

近年、小動物においても食餌の質や飼育環境の向上などによる寿命の延長に伴い、腫瘍疾患の発生が著しく増加している [1]。従来からの腫瘍治療法である外科手術、化学療法および放射線療法 [2] は効果的であるが侵襲も大きい。生活の質 (QOL; Quality of life) を維持することが重要視される小動物の治療法として必ずしも適切であるとはいえない。そこで腫瘍に対する副作用の少ない治療法として免疫療法が注目されている。その一つである活性化リンパ球療法は、腫瘍罹患症例から採取したリンパ球を増殖因子とともに体外で培養して活性化し、当該症例に繰り返し投与して抗腫瘍免疫を活性化させる治療法である [3-6]。本法は投与した活性化リンパ球による直接的な細胞傷害効果と、それらの細胞から分泌されるインターフェロン (IFN) - γ やインターロイキン (IL) -2 などによる免疫賦活作用の両方による抗腫瘍効果が期待される [7]。腫瘍罹患症例は、一般的に免疫抑制状態に陥っていることが多く、それに伴いQOLの低下が起こる [8-10]。人医学において、そのような症例に対して活性化リンパ球の投与により免疫機能を賦活し、QOLを改善することが可能であったと報告 [4] されており、小動物においても同様の効果が期待される。

今回、北海道大学大学院獣医学研究科附属動物病院に来院した悪性腫瘍罹患犬10症例に腫瘍減量療法の後、

活性化リンパ球療法を実施し、QOLや免疫動態を観察してその有効性について評価した。

材 料 お よ び 方 法

症例：対象は2005年3月から2007年9月に北海道大学附属動物病院に来院した悪性腫瘍罹患犬10症例 (表1) である。原則として、何らかの方法で原発腫瘍の制御を行った後、飼い主の同意を得て活性化リンパ球療法を実施した。

活性化リンパ球の培養および投与方法：症例の一般状態および体重に応じて10～40ml採血し、比重遠心法にて末梢血単核球細胞 (PBMC) を分離した [11, 12]。PBMCの培養は、Ebinaら [5] およびItohら [13] の方法をあわせ、一部改変して以下 [7] のように行った。PBMC 3.0×10^7 個を、RPMI1640 + 9 (ヒトリコンビナント (hr; human recombinant) IL-2 : 1,000RU/ml, (株)日研生物医学研究所, 京都), RPMI1640 (GIBCO BRL, Gaithersburg, U.S.A.) および牛胎児血清 (FBS : Moregate Biotech, Bulimba, Australia) をそれぞれ7 : 2 : 1に混合した完全培養液 (Complete medium, hrIL-2 : 700RU/ml, 10% FBS) 10mlに浮遊させ、マウス抗犬CD3抗体 (1mg/ml, Serotec, Oxford, U.K.) 25 μ lを生理食塩水5mlで希釈し、24時間固着させた75cm²培養フラスコにて培養を開始し、培

† 連絡責任者：奥村正裕 (北海道大学大学院獣医学研究科獣医外科学教室)

〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目 ☎・FAX 011-706-5229 E-mail : okumuram@vetmed.hokudai.ac.jp

表1 活性化リンパ球療法を実施した症例の内訳

症例	品 種	性	年齢	体重 (kg)	腫 瘍	発生部位	治療法	TNM分類	臨 床 ステージ
1	ゴールデンレトリバー	M	7	36.2	骨肉腫	尺 骨	摘出手術	T ₂ N ₀ M ₀	II
2	ゴールデンレトリバー	FS	7	33.5	扁平上皮癌	鼻 腔	放射線療法, 光線力学療法	T ₂ N ₁ M ₁	IV
3	雑 種	FS	13	11.9	移行上皮癌	膀 胱	摘出手術	T ₂ N ₀ M ₀	II
4	セントバーナード	M	5	70.3	骨肉腫	大腿骨	摘出手術, 化学療法	T ₂ N ₀ M ₀	II
5	ビーグル	FS	11	13.8	扁平上皮癌	下顎骨	摘出手術	T _{3b} N ₀ M ₀	IV
6	ゴールデンレトリバー	M	6	43.8	組織球肉腫	膝関節	摘出手術	分類不能	
7	パピヨン	FS	12	8.2	扁平上皮癌	前頭洞	光線力学療法	T ₂ N ₁ M ₀	II
8	ウエルシュコーギー	FS	9	9.4	骨肉腫	中足骨	摘出手術	T ₁ N ₀ M ₀	II
9	ゴールデンレトリバー	MC	11	29.4	肝細胞癌	肝 臓	な し	T ₂ N ₀ M ₀	II
10	シーズー	M	7	4.2	腺 癌	消化管	摘出手術	T ₂ N ₁ M ₁	IV

養開始日を0日目とした。培養は37℃、5%CO₂条件下で行った。4日目にComplete mediumを5ml追加し、8日目よりhrIL-2 175 RU/ml、2.5%FBSとなるようにComplete mediumとRPMI1640を1:3に混合した培養液を用い、CO₂透過性の培養バッグ（A-350、ニプロ株、大阪）にて14日目まで培養した。14日目に細胞浮遊液を回収し、50mlの遠沈管に分注して850×g、22℃で10分間遠心して上清を吸引除去し、hrIFN-α（interferon alpha A, PBL Biomedical Laboratories, NZ, U.S.A.）15U加RPMI1640+9培養液15mlに浮遊させ、15分間37℃、5%CO₂で再活性化した。その後PBSで2回洗浄して細胞を計数し、生理食塩水に浮遊させてこれを培養活性化リンパ球（ACL: Activated lymphocyte）とした。得られたACLを自己血清とともに当該症例の静脈内に投与した。2～4週間隔でPBMCを採取し、その14日後にACLの投与を行い、4～12回繰り返して実施した。なお無菌性試験として14日目の培養液を検体とし、発色合成基質法によりエンドトキシン濃度の測定およびTaKaRa PCR Mycoplasma Detection Set（タカラバイオ株、滋賀）によりマイコプラズマの検出を行った。いずれの培養液においてもエンドトキシン濃度は検出限界以下（<5pg/ml）であり、マイコプラズマは検出されなかった。

PBMCの増殖活性：それぞれの症例のPBMC数と14日間の培養により得られたACL数の平均をそれぞれ計数し、細胞増殖率を算出した。

PBMCおよびACLを構成する細胞の表面抗原解析：フローサイトメトリーによってPBMCおよびACLの表面抗原の解析を行い、構成細胞比の変化を観察した。PBMCおよびACLをフルオレセインイソチオシアネート標識ラット抗犬CD4抗体（Serotec）、R-フィコエリスリン標識ラット抗犬CD8抗体（Serotec）を用いて標識し [13]、フローサイトメーター（EPICS XL EXPO32 ADC, Beckman Coulter Inc., Fullerton,

表2 各症例における活性化リンパ球の投与回数、末梢血単核球の平均増殖率および経過

症例	投与回数	増殖率 (倍)	死 因	診断から死亡 までの期間
1	4回	17.42	—	37カ月；生存中
2	6回	15.60	肺転移の拡大	48カ月
3	4回	0.03	慢性腎不全	12カ月
4	12回	2.59	DIC	14カ月
5	7回	0.87	心不全	6カ月
6	7回	0.57	全身転移	6カ月
7	4回	0.60	脳転移	4カ月
8	6回	4.34	—	10カ月；生存中
9	6回	4.86	—	9カ月；生存中
10	6回	2.56	—	8カ月；生存中

DIC：播種性血管内凝固症候群

2007年12月現在

末梢血単核球細胞の増殖率は末梢血単核球細胞数とそれぞれの培養によって得られた活性化リンパ球数とから算出し、症例ごとに平均値を算出した。末梢血単核球細胞の増殖率が高い症例は、長期生存が期待される傾向がみられた。

U.S.A.）にて表面抗原を解析した。なおPBMCではリンパ球ゲートを設定して測定した。

血清IFN-γ濃度の測定：すべての症例で血清中のIFN-γ濃度を測定した。IFN-γ濃度は、Canine IFN-γ immunoassay（Quantikine, R & D Systems Inc., Minneapolis, U.S.A.）を用いて測定した。

経過および飼い主に対する聞き取り調査：ACL投与直前に一般身体検査、血液学的および血液生化学的検査（AST, ALT, ALP, BUN, CreおよびGlu）を行った。飼い主からACL投与前後における食欲、活動性および排便の状態について聴取し記録した。投与期間中は1または2週間隔で診察して血液学的および血液生化学的検査を行い、その後は1カ月間隔で経過を観察した。定期検診時に詳しい稟告の聴取および血液検査の他、X線検査および超音波検査によって腫瘍の再発および転移の

図1 末梢血単核球細胞の構成細胞比の変化

活性化リンパ球投与前，投与期間中（投与開始1週間後から最終投与1週間後まで）および投与終了後（最終投与2週間後から）の末梢血単核球細胞の構成細胞比の変化を10症例の平均で表した。活性化リンパ球投与期間中は投与前と比較するとDN細胞比の減少，CD4⁺細胞比およびCD8⁺細胞比の増加が認められた。しかし，投与終了後にはふたたびDN細胞比の増加，CD4⁺細胞比およびCD8⁺細胞比の減少が認められた。

DN：CD4とCD8の両陰性

DP：CD4とCD8の両陽性

有無を確認した。

成 績

細胞増殖率：すべての症例におけるACLの投与回数，PBMCの平均増殖率および経過を表2に示した。PBMCの増殖率は0.03倍から17.42倍（平均4.94倍）であった。1例を除き増殖率が1.00以下の症例（症例5，6および7）では診断から6カ月以内に死亡しており，1.00以上の症例（症例1，2，4，8，9および10）では6カ月以上の生存が可能であった。

構成細胞比の変化：ACLではPBMCに比較してCD4⁺CD8⁺細胞比の減少，CD4⁺細胞比，CD8⁺細胞比およびCD4⁺CD8⁺細胞比が増加する傾向が認められた。また，すべての症例でACL投与期間中PBMCの構成細胞比において，CD4⁺CD8⁺細胞比が減少し，CD4⁺細胞比およびCD8⁺細胞比が増加する傾向が認められた（図1）。しかし，最終投与より2週以降はふたたびCD4⁺CD8⁺細胞比が増加し，CD4⁺細胞比およびCD8⁺細胞比が減少する傾向が認められた。

血清IFN- γ 濃度の変化：血清IFN- γ 濃度は5症例で検出限界以下であり，3症例で変動を認めなかった。顕著な上昇を示した2症例（症例6および10）の経時的変化を図2に示した。2症例ともにACL投与前のIFN- γ 濃度は検出限界以下であったが，症例6では第3回ACL投与後から，また症例10では第4回ACL投与後から

 図2 血清インターフェロン- γ 濃度の変化

診断した日を0日目とし，活性化リンパ球投与日を↑で示した。

症例6では第3回活性化リンパ球投与から，徐々にインターフェロン- γ 濃度が上昇し，投与終了1カ月後も依然として高い値を保っていた。症例10では第4回投与から徐々にインターフェロン- γ 濃度が上昇し，最終投与時にピークを迎えたが，投与終了3カ月後にはかなり低下した。これら2症例では活性化リンパ球の投与に伴い一般状態が改善したとの稟告が得られた。

徐々にIFN- γ 濃度が上昇し，第6回投与時にピークを示した。症例6では投与終了2週後も依然として高いIFN- γ 濃度が認められた。投与終了3カ月後に測定した症例10のIFN- γ 濃度は顕著に低下していた。症例6は診断から6カ月後に死亡したが症例10は現在も生存中である。

副作用の有無，経過および飼主に対する聞き取り調査：全症例において観察期間中，特に発熱やアレルギー反応等に関連した副作用は認められず，血液学的および血液生化学的検査の結果，異常値は認めなかった。また，飼主に対する聞き取り調査の結果，ACL投与に関連した身体的および一般生活上の異常は認められなかった。

それぞれの症例における経過を表2に示した。2007年12月現在，生存4例，死亡6例である。生存している骨肉腫2症例はどちらも外科手術後の補助療法は活性化リンパ球療法のみであるが，症例1では診断から3年が経過しており，症例8においても腫瘍の再発および転移は認められていない。肝細胞癌の症例9は，現段階では明確な進行は認められていない。症例10は診断時で

に腹腔内に転移が認められた消化管腺癌の症例であるが、QOLは十分保たれている。死亡した症例のうち扁平上皮癌の症例2および7の2症例はACL投与開始時すでに転移が確認されていたが、症例2では診断から48カ月と長期生存した。移行上皮癌の症例3では剖検時に腫瘍の再発および転移は認められなかった。扁平上皮癌の症例5はACL投与開始時に局所再発が認められており、診断時転移の認められなかった骨肉腫の症例4および組織球肉腫の症例6では死亡時に転移が認められた。

考 察

PBMCの増殖率についてはかなりの個体差が認められ、14日間の培養によりPBMCが十分増加する症例、ほとんど増加しない症例などさまざまであった。また、細胞の増殖率の高い症例では生存期間が長い傾向にあった(表2)。PBMCにおいて、活性化刺激により増殖する細胞はほとんどがCD3⁺のT細胞である[7, 13]ことから、増殖率の高かった症例では比較的T細胞機能が保たれていたことが推測された。しかしながら、健常犬のPBMCの14日間培養後の増殖率が平均57.4倍であった[7]のに比べて症例犬の増殖率は平均4.94倍ときわめて低かった。腫瘍罹患症例はT細胞の機能が抑制されている[8-10]といわれているが、今回の症例犬においても同様のことが考えられた。

また、ACLではPBMCと比較するとCD4⁺細胞比およびCD8⁺細胞比の増加が認められた。また結果は示していないが、*in vitro*においてACLではPBMCに比較して腫瘍細胞傷害率が上昇した症例も存在した。この結果は健常犬で誘導されたACLの性状と同様であった[7]ことから、腫瘍罹患症例犬でも健常犬と同様に活性化されたリンパ球の誘導が可能であったと考えられた。

ACL投与に伴い、すべての症例でPBMCにおける構成細胞比の変化が認められ、CD4⁺細胞およびCD8⁺細胞の割合が増加した。しかし、投与終了後にはCD4⁺細胞およびCD8⁺細胞の割合が減少する傾向にあった(図1)。Itohら[13]の報告においても同様の現象が報告されており、免疫が抑制されている腫瘍罹患症例においてもACLを複数回投与することにより一時的に細胞性免疫を活性化することが可能であると思われる[14]。

また、血清IFN- γ 濃度の著しい変化を示した症例は2症例のみであった(図2)。これら2症例では投与期間中にIFN- γ 濃度が徐々に上昇し、最終投与時には投与前の2,000倍近くに上昇していた。2症例ともに投与終了後はIFN- γ 濃度が低下する傾向を示した。これら2症例ではACLの投与に伴い一般状態が改善したことから、ACLを複数回投与することによりNK細胞などのIFN- γ 産生細胞が一時的に増加したと考えられ、細胞性免疫が活性化された可能性が示唆された。IFN- γ 濃度の変

化は健常犬においても同様の現象が認められており[7]、今まで明確な評価法のなかった本治療法の有用な評価方法になり得るものと思われた。しかしながら今回の症例に関しては個体差が大きく、また一般状態の安定していた数症例では検出限界以下であったため、活性化リンパ球投与によるIFN- γ 濃度の変化に関しては、測定法の見直しとともに今後の検討課題であると思われた。また、IFN- γ の過剰産生による副作用が人において報告されている[15]ため、経過を十分に観察する必要があると思われた。

今回の研究では1例を除いて何らかの方法で原発腫瘍を制御した後に活性化リンパ球療法を実施しており、厳密な意味での本治療法単独の抗腫瘍効果判定は難しい。しかし、活性化リンパ球療法は、腫瘍罹患症例においても重篤な副作用を発現することなく、細胞性免疫応答の活性化により症例のQOLを維持し、腫瘍の転移および増殖抑制にも有効な役割を果たす可能性があるものと考えられた。

引 用 文 献

- [1] Craig LE : Cause of death in dogs according to breed : a necropsy survey of five breeds, J Am Anim Hosp Assoc, 37, 438-443 (2001)
- [2] Blackwood L, Dobson JM : Radiotherapy of oral malignant melanoma in dogs, J Am Vet Med Assoc, 209, 98-102 (1996)
- [3] Grimm EA, Robb RJ, Roth JA, Neckers LM, Lachman LB, Wilson DJ, Rosenberg SA : 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)
- [4] Ebina T, Ogama N, Shimanuki H, Kubota T, Isono N : Life-prolonging effect of immunocell BAK (BRM-activated killer) therapy for advanced solid cancer patients : prognostic significance of serum immunosuppressive acidic protein levels, Cancer Immunol Immunother, 52, 555-560 (2003)
- [5] Ebina T, Ogama N, Shimanuki H, Kubota T, Isono N : Effector mechanism and clinical response of BAK (BRM-Activated Killer) immuno-cell therapy for maintaining satisfactory QOL of advanced cancer patients utilizing CD56-positive NIE (neuro-immuno-endocrine) cells, Microbiol Immunol, 45, 403-411 (2001)
- [6] Roussel E, Gerrard JM, Greenberg AH : Long-term cultures of human peripheral blood lymphocytes with recombinant human interleukin-2 generate a population of virtually pure CD3⁺ CD16⁻ CD56⁻ large granular lymphocyte LAK cells, Clin Exp Immunol, 82, 416-421 (1990)
- [7] Hoshino Y, Takagi S, Osaki T, Okumura M, Fujinaga T : Phenotypic analysis and effects of sequential administration of activated canine lymphocytes on

- healthy beagles, J Vet Med Sci, 70, 581-588 (2008)
- [8] Tada T, Sano H, Sato S, Shima J, Fujiwara H, Hamaoka T : Immune dysfunction expressed selectively on L3T4⁺ T cells in the tumor-bearing state, J Leukoc Biol, 47, 149-157 (1990)
- [9] Yamamoto N, Zou JP, Li XF, Takenaka H, Noda S, Fujii T, Ono S, Kobayashi Y, Mukaida N, Matsushima K, Fujiwara H, Hamaoka T : Regulatory mechanisms for production of IFN- γ and TNF by antitumor T cells or macrophages in the tumor-bearing state, J Immunol, 154, 2281-2290 (1995)
- [10] Zou JP, Nagata T, Yamamoto N, Ono S, Fujiwara H, Hamaoka T : Tumor-bearing mice exhibit a progressive increase in tumor antigen-presenting cell function and a reciprocal decrease in tumor antigen-responsive CD4⁺T cell activity, J Immunol, 148, 648-655 (1992)
- [11] Boyum A : Separation of leukocytes from blood and bone marrow, Scand J Clin Lab Invest Suppl, 97, 7 (1968)
- [12] Kol R, Friedlander M, Riklis E, Raveh D : Separation of human lymphocytes on Ficoll-Paque gradients : stimulation of cells and depletion of a concanavalin-A responsive radioresistant subpopulation, Radiat Res, 95, 108-115 (1983)
- [13] Itoh H, Kakuta T, Kudo T, Sakonju I, Hohdatsu T, Ebina T, Takase K : Bulk cultures of canine peripheral blood lymphocytes with solid phase anti-CD3 antibody and recombinant interleukin-2 for use in immunotherapy, J Vet Med Sci, 65, 329-333 (2003)
- [14] Salvadori S, Martinelli G, Zier K : Resection of solid tumors reverses T cell defects and restores protective immunity, J Immunol, 164, 2214-2220 (2000)
- [15] Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, Buchanan LJ, Larsen G, Atkins MB, Sosman JA, Dutcher JP, Vogelzang NJ, Ryan JL : Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production, Blood, 90, 2541-2548 (1997)

Activated Lymphocyte Therapy for 10 dogs with Spontaneous Malignant Tumor

Yuki HOSHINO*, Satoshi TAKAGI, Tomohiro OSAKI, Masahiro OKUMURA[†]
and Toru FUJINAGA

* Laboratory of Veterinary Surgery, Department of Veterinary Clinical Sciences, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, 060-0818, Japan

SUMMARY

Autogenous activated lymphocytes were sequentially administered as an adjuvant antitumor therapy to 10 dogs with spontaneous malignant tumors in the Veterinary Teaching Hospital at Hokkaido University. Peripheral blood mononuclear cells from tumor-bearing dogs were proliferated and activated for 14 days in culture using anti-canine CD3 antibody and human recombinant IL-2. The cells obtained were reactivated using IL-2 and human recombinant IFN- α . After sequential administration of these activated lymphocytes, proportions of CD4⁺ cells and CD8⁺ cells were changed in the peripheral blood in all cases, while serum IFN- γ concentration increased in two cases. These results suggest the possibility of strengthening cell-mediated immunity. The general physical conditions of all 10 patients remained stable, and the patients were comfortable during the entire period of lymphocyte administration. This shows that the quality of life of these tumor-bearing dogs was maintained in a relatively favorable state, with no evidence of any adverse effects in response to the sequential infusion of activated lymphocytes. As an adjuvant antitumor therapy, activated lymphocyte therapy is therefore believed to be applicable to and effective for tumor-bearing animals whose immunity may be somewhat suppressed. This therapy may encourage cell-mediated immunity against tumor growth and distant metastasis. — Key words : activated lymphocyte, anti-CD3 antibody, canine, IL-2.

[†] Correspondence to : Masahiro OKUMURA (Laboratory of Veterinary Surgery, Department of Veterinary Clinical Sciences, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

Kita-18 Nishi-9, Sapporo, 060-0818, Japan

TEL · FAX 011-706-5229 E-mail : okumura@vetmed.hokudai.ac.jp

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 62, 383 ~ 387 (2009)