



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 悪性腫瘍凍結療法における免疫応答に関する研究：<br>凍結壊死Meth A細胞接種の際にみられるナチュラルキラー活性とキラーT細胞の消長の機序             |
| Author(s)    | 中澤, 光博  |
| Citation     | 大阪大学, 1985, 博士論文  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/34630">https://hdl.handle.net/11094/34630</a> |
| rights       |   |
| Note         |   |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 【4】

|         |  |         |         |         |
|---------|--|---------|---------|---------|
| 氏名・(本籍) | なか<br>中  | さわ<br>澤 | みつ<br>光 | ひろ<br>博 |
| 学位の種類   | 歯  | 学       | 博       | 士       |
| 学位記番号   | 第  | 6840    | 号       |         |
| 学位授与の日付 | 昭和   | 60      | 年       | 3月25日   |
| 学位授与の要件 | 歯学研究科  | 歯学臨床系専攻 |         |         |
|         | 学位規則第5条第1項該当                                   |         |         |         |
| 学位論文題目  | 悪性腫瘍凍結療法における免疫応答に関する研究                         |         |         |         |
|         | —凍結壊死Meth A細胞接種の際にみられるナチュラルキラー活性とキラーT細胞の消長の機序— |         |         |         |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教 授 作田 正義                              |         |         |         |
|         | (副査)<br>教 授 岡田 宏 教 授 小谷 尚三 講 師 西尾順太郎           |         |         |         |

## 論 文 内 容 の 要 旨

生体内に悪性腫瘍が発生すると、それに対して様々な免疫応答が起こるが、その免疫能を利用して、癌の治療効果を上げようとする試みが多数なされている。

悪性腫瘍に対する凍結手術は、凍結壊死に陥った腫瘍組織が大量の抗原として作用すると考えられることから、凍結手術には腫瘍組織の破壊だけでなく、腫瘍特異的免疫療法としての期待がもたれる。しかし、その効果については異論があり、またそれによる免疫系の変化についても詳しく研究されていない。本研究では、凍結破壊腫瘍細胞接種後の免疫応答の発現の様相を細胞性免疫、特にナチュラルキラー（NK）細胞とキラーT細胞（CTL）の発現を中心に調べ、悪性腫瘍治療における凍結手術の有用性を検討した。

実験にはBALB/cマウスとMeth A（メチルコラントレン誘発線維肉腫）の系を用いた。

凍結処理には、東理社製クライオバーを用い、PBS（-）で $1 \times 10^7$ コ/mlに調整したMeth Aを試験管内で-60°Cに下げて凍結し、融解した（Cryo-Meth A）。また、対照としてマイトイシンCで処理したMeth A（MMC-Meth A）を用いた。これらMMC-またはCryo-Meth Aの $1 \times 10^6$ コ相当量をマウス腹腔内に接種し、3, 7および14日目のNK, CTL活性を測定した。NKおよびCTL活性はそれぞれ、YAC-1およびMeth Aを標的細胞として4時間または12時間の<sup>51</sup>Cr放出試験にて求めた。

脾臓におけるNK活性は、MMC-およびCryo-Meth A接種後3日目に一過性に上昇し、MMC群ではその後低下するのに対し、Cryo群ではさらに14日目に大きなNK活性が出現した。

MMC-またはCryo-Meth A接種後7, 10および14日目のマウスの血清および脾細胞の培養上清中のインターフェロン（IFN）とプロスタグランдинE（PGE）の活性を測定した。IFN活性は、

マウスL細胞と水疱性口内炎ウイルスを用いてCPE<sub>50</sub>法により測定し、PGEはクリニカルアッセイ社のPGE測定キットを用いて定量した。Cryo群では、10日目の脾細胞が高いIFN産生能を有し、Cryo-Meth A接種後14日目の高NK活性は、このインターフェロンによることが示唆された。また、脾細胞のPGE産生能および血中PGE濃度は、Cryo群の方が常に高いが、MMC、Cryo両群において、量依存的にNK活性の抑制に関与しており、ともにインドメタシン投与によりNK活性は大きく上昇した。

一方、脾臓におけるCTL活性は、MMC群では10～14日目に出現するが、Cryo群では全く誘導できなかった。さらにMMC-Meth A接種マウスにCryo-Meth Aを接種すると、CTLの誘導が妨げられた。また、MMC-Meth A接種後3日目のマウスの脾リンパ球をin vitroにおいてCryo-Meth Aで二次刺激すると、同様にCTLの誘導が妨げられた。このようなCTL誘導の失敗は、Cryo-Meth A接種後にLyt-1<sup>-</sup>, 2<sup>+</sup>のphenotypeをもつサプレッサーT細胞の誘導されることが原因であると考えられる。

次にインターロイキン2(IL-2)について調べた。IL-2の定量は、マウス胸腺細胞を用いたCo-stimulator assayによった。脾細胞のIL-2産生能は、MMC群では7～14日目に急激に高まるが、Cryo群では大きな変化は認められなかった。また、in vivoにおいてIL-2を投与したり、in vitroでリンパ球をIL-2処理することにより、MMC群ではNK活性、CTLとともに増強が認められたが、Cryo群では著明な変化がなく、IL-2を効果的に利用できないことが示された。すなわち、Cryo群ではIL-2を介するCTL誘導経路に障害のあることが示唆された。しかし、MMC-Meth A接種後3日目のリンパ球をin vitroでCryo-Meth Aと混合培養する際にMφを含む付着細胞を添加すると、CTL誘導は部分的に回復することから、Cryo群においてもMφのCTL誘導を補助する能力は消失していないことが示された。

以上のごとく、MMC群とCryo群とでは、IFN, PGEおよびIL-2等の可溶性因子の誘発能に大きな違いがあった。特に、凍結破壊腫瘍細胞はIFN inducerとして作用し、IFNを介してNK活性を増強させるが、一方でサプレッサーT細胞の誘導能も高く、またIL-2産生能やIL-2に対する反応性の低下から、CTLの誘導を極めて困難にすることが判明した。

すなわち、凍結療法はNK細胞を強く活性化するが、腫瘍排除に最も直接的で強力な作用を發揮するCTLを誘導できないことから、腫瘍特異的免疫療法としては低い評価しか与えられないが、サプレッサーT細胞の出現を抑制する手段を併用したり、高NK活性誘導能を利用することにより、有効な治療手段となることが示唆された。

#### 論文の審査結果の要旨

本研究は、癌治療法の1つである凍結療法のモデル実験として、凍結壊死させたMeth A腫瘍細胞の接種が宿主免疫系に及ぼす影響について多面的に検討したものである。

その結果、凍結療法はナチュラルキラー(NK)活性を高めるが、腫瘍細胞に特異的なキラーT細胞

(C T L) を誘導できないことを示唆する所見が得られた。さらに、その機序を検索した結果、凍結破壊した腫瘍細胞は、インターフェロンのインデューサーとして作用し、このインターフェロンを介して、NK活性を増強させるが、その反面インターロイキン2 (I L-2) 產生能や I L-2 に対する反応性を低下させることにより C T L の誘導を抑制することが示唆された。なお、プロスタグランдин E (P G E) の関与についても検討し、凍結壊死腫瘍細胞の接種により P G E の產生能が高められ、NK活性が抑制されるとの結果が得られた。

これらのモデル実験で得られた所見は、凍結療法の癌免疫療法としての評価に重要な指針を与えるものであり、臨床的立場からもその価値は高い。

したがって、本研究者は、歯学博士の学位を得る資格があると認める。