

Title	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
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	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

原著

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

中澤 光博

大阪大学歯学部口腔外科学第2講座

(主任: 作田 正義 教授)

## 緒 言

凍結手術 (cryosurgery) は、局所病変の超低温による破壊、凍結壊死を目的とした治療法である。このような試みは古くから行われていたが、1961年に Cooper ら<sup>1)</sup> が治療手段として確立して以来、臨床各科において応用されるようになった。口腔領域においても Gage ら<sup>2)</sup> (1965)、Emmings ら<sup>3)</sup> (1967) 以来、各種疾患に應用され、粘膜疾患や血管腫などの良性病変については極めて有効な治療法であるとの評価を得ている。

一方、Yantorno ら<sup>4)</sup> (1967)、Shulman ら<sup>5) 6)</sup> (1968) および Riera ら<sup>7)</sup> (1968) は、ウサギの付属腺に凍結手術を行ない、種特異的かつ臓器特異的な液性抗体の出現を認めたことから、凍結手術は凍結破壊組織に特異的な自己免疫反応を誘導することが示された。凍結手術のこのような特徴を、悪性腫瘍の治療にも応用すべく研究が進められた。Blackwood ら<sup>8)</sup> (1972) は、

担癌マウスの血清中に抗体の存在することを  
証明し、Neel ら<sup>9)</sup>(1973)は、癌凍結手術後のマ  
ウスは同じ腫瘍を移植しても拒絶することを  
認めた。さらに望月<sup>10)</sup>(1981)は、凍結免疫を獲  
得した担癌ラットのリンパ球を他のラットに  
移入することによって、受動免疫が得られる  
ことを示した。

すなわち、悪性腫瘍の凍結療法は、腫瘍組  
織の破壊と同時に、組織の特異抗原物質いわ  
ゆる腫瘍特異抗原 (Tumor specific antigen )  
あるいは腫瘍関連抗原 ( Tumor associated  
antigen ) といわれる物質が、そのままの形で  
あるいは変性された状態で放出され、その腫  
瘍に特異的な免疫応答を誘導するという、腫  
瘍特異的免疫療法としての期待が持たれるよ  
うになった。しかし、その後の研究では、悪  
性腫瘍の凍結手術が特異的な細胞性免疫や抗  
体産生を増強するという報告<sup>11)-16)</sup> がある反  
面、抑制するという逆の報告<sup>17)18)</sup> もみられ、  
一致した見解が得られておらず、臨床への応

用も一部の臓器を除いては消極的である。

本研究では、マウスを用いて、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（cytotoxic T lymphocyte, CTL）の発現を中心に調べ、さらにこれらの消長の機序についても解析し、悪性腫瘍免疫療法としての凍結手術の有用性を検討した。

## 実験材料ならびに実験方法

### 1. 実験動物

大阪大学純系動物事業場より供給された生後5-8週令のBALB/c UCSD マウスを使用した。

### 2. 腫瘍細胞

1) Meth A : BALB/c マウスより発生したメチルコラントレン誘発線維肉腫 Meth A（東北大学薬学部 橋本嘉幸教授より患子を受けた）を実験に用いた。

2) YAC-1 : Moloney virus 誘発リンパ腫 YAC-1 は、大日本製薬（大阪）より入手し、NK 活

性測定の際の標的細胞として用いた。

3) L-929 : マウス線維芽細胞株 L-929 (大日本製薬, 大阪, より入手) は, インターフェロンの定量に用いた。

### 3. 細胞培養

Meth A および YAC-1 は, 10% FCS (GIBCO Lab., USA), 2% ペニシリン・ストレプトマイシン混合液 (Flow Lab., USA) および重曹を含む RPMI1640 培養液 (日水製薬, 東京) を用いて, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養器 (ALSCO 社製, USA) 中で培養した。培養液は, 2~3 日ごとに交換した。

L-929 は, 5% 仔牛血清 (阪大微生物病研究会, 大阪), 1% L-グルタミン (和光純薬大阪), および重曹を含むイーグル最少必須培地 (E-MEM, 日水製薬, 東京) を用いて, 上記と同様に培養維持した。

### 4. 細胞浮遊液の調整

L-929 の場合は, 0.05% トリプシン (阪大微生物病研究会, 大阪) および 0.15% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, 半井化学薬品, 京都

) を含む PBS(-) (pH 7.2) (以下, EDTA - トリプシン溶液と略す) で, 単層培養細胞をシャーレ底面よりはがし, 単細胞浮遊液とし, PBS(-) で3回洗浄後, ふたたび PBS(-) で浮遊液として Bürger-Türk 型血球計算盤にて細胞数を算定した。なお, Meth A および YAC-1 は浮遊状態で継代培養されているので, EDTA - トリプシン溶液での処理は行なわずに細胞数を算定した。

### 5. 細胞の凍結処理

CRYOBAR MODEL CS45-3 (東理社, 埼玉) を使用した。すなわち, Meth A を PBS(-) で  $1 \times 10^7$  個/ml に調整し,  $\phi 15$  mm の試験管に入れ, そこに CRYOBAR の凍結端子 (プローブ) を挿入して  $-60^{\circ}\text{C}$  に下げて凍結し, その状態で5分間維持した後, 自然融解した (以下, これを Cryo-Meth A と略す)。なお, トリパンブルー染色法により, この処理後には生細胞の存在しないことを確認した。

### 6. 細胞のマイトマイシンC処理

凍結処理の対照として, マイトマイシンC

(MMC, 協和発酵, 東京) で処理した Meth A を用いた。すなわち, MMC 溶液 ( $50\mu\text{g}/1\text{ml}$  PBS(-)) に Meth A を  $2 \times 10^6$  個/ml とするよう浮遊して,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  中で 30 分間処理した。(これを, MMC-Meth A と略す)。これを PBS(-) で 3 回洗浄したものをマウスに接種した。この処理後の細胞の生存率は, トリパンブルー染色法により, 常に 95% 以上を示した。

## 7. 細胞障害試験

### (1) エフェクター細胞の調製

#### a) 脾リンパ球の分離法

マウスより無菌的に脾臓を摘出し, ステンレス網製サイトシーブ (#80, 亀井商店, 大阪) 上でプラスチック棒を用いて, すりつぶした。これを, RPMI1640 培養液に浮遊させ, 軽くピペティングを繰り返して均等な細胞浮遊液とした。この細胞浮遊液から, Conray 400 (第一製薬, 東京) - Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) (比重 1.090) を用いる比重遠沈法<sup>19)</sup>により, リンパ球を採取した。



## b) 付着細胞の分離法

プラスチックシャーレ付着法<sup>20)</sup>を用いた。

すなわち、脾細胞  $1 \times 10^7$  個を 5ml の培養液 (RPMI1640, 10%FCS) に浮遊させ、それを一晚  $4^\circ\text{C}$  で FCS 処理したプラスチックシャーレに入れ、60分間  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養器中に置いた。培養終了後、シャーレを振盪し、上清を除去して、さらに 2~3回  $37^\circ\text{C}$  に加温した培養液を加え、振盪後上清を捨てて非付着細胞を除去した。次に、シャーレに冷却したキレート液 (PBS(-) 95ml, FCS 5ml, EDTA 0.2g の混合液) 5ml を加え、約30分間  $4^\circ\text{C}$  で反応させたのち軽くピペッティングをして浮遊してきた付着細胞を採取した。これを、PBS(-) で3回洗浄後、実験に供した。

## (2) 標的細胞の調整

NK assay では YAC-1 を、CTL assay では Meth A を、それぞれ標的細胞として用いた。これら標的細胞  $5 \times 10^6$  個を  $^{51}\text{Cr}$ -Sodium chromate (Specific activity; 0.24mCi/ $\mu\text{g}$ , Amersham, England)  $50\mu\text{Ci}$  を含む

RPMI1640 培養液 (10%FCS) を 3 回洗浄し、 $2 \times 10^5$  個/ml の細胞浮遊液に調整して実験に供した。

### (3) NK 活性の測定

Brunner ら<sup>21)</sup> の  $^{51}\text{Cr}$  放出試験を用いた (図 1)。

すなわち、マイクロプレート (96 V-shape wells, Flow Lab., CAT NO. 76-013-05) に上述のようにして調製し

たエフエクター細胞 (脾リンパ球) と標的細胞 (YAC-1) を、それぞれ  $1 \times 10^6$  個/0.1 ml およ

び  $2 \times 10^4$  個/0.1 ml を加え (E/T ratio=50:1), 1 well あたりの全量を 0.2 ml とし、 $37^\circ\text{C}$ , 5

%  $\text{CO}_2$  培養器中で 4 時間、静置培養した。な

お、対照には、エフエクター細胞を含まない培養液 0.2 ml を分注した。培養終了後、各

well より上清の 0.1 ml を採取し、その放射活性 (cpm) をガンマカウンター (LKB 1280COMPUGAMMA,

Finland) により測定した。なお、実験群および

対照群は、全上清 0.2 ml のうち 0.1 ml のみを測定しているの<sup>2)</sup>。すべて 2 倍し、それをそ

れぞれ cpm of experimental release および cpm of

control release とし、次式に代入して、% of

specific release を算出し、その値を NK 活性とした。

% of specific release

$$\frac{\text{cpm of experimental release} - \text{cpm of spontaneous release}}{\text{cpm of maximum release} - \text{cpm of spontaneous release}} \times 100$$

また、実験ごとに control の値が変動するため、各実験間の NK 活性の比較には、次式のようにして求めた刺激係数 Stimulation Index(S.I.)を用いた。

$$\text{S.I.} = \frac{\text{実験群の \% of specific release}}{\text{control群の \% of specific release}}$$

#### (4) CTL 活性の測定

標的細胞に Meth A を用いたこと、混合培養の時間を 12 時間にしたこと、および IFN- $\gamma$  ター細胞を後述 (12. 抗体処理参照) のように抗アシアロ GM1 抗体で処理して NK 細胞を除いたものを用いたこと以外は、上述の NK 活性の測定と同様の方法で行なった。

#### 8. インターフェロンの定量 (図 2)

Vilček ら<sup>22)</sup> の方法と一部改変<sup>23)</sup> して用いた。  
 すなわち、マウス L-929 細胞を microculture plate  
 (96 flatbottom wells, Flow Lab., CAT. NO. 76-003-03) の各  
 well に  $3 \times 10^4$  / 0.2 ml ずつ加え、一晩培養して  
 5 monolayer とした。培養上清を吸引除去し、そ  
 こに 2 倍の段階希釈をしたサンプル ( $2^0 \sim 2^{-9}$   
 場合には、7 は  $2^0 \sim 2^{-10}$ ) を 0.1 ml ずつ加え、  
 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 中で 24 時間 インキュベートし  
 た。その後サンプルを吸引除去し、イーグル  
 10 MEM 培養液 (5% CS) で 100 TCID<sub>50</sub> / 0.1 ml に調整  
 した水疱性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis  
 virus, VSV) を各 well に加え、さらに 24 ~ 48  
 時間 インキュベートした。インキュベート終  
 了後、位相差顕微鏡 (日本光学, 東京) にて  
 15 細胞変性効果 (cytopathic effect, CPE) を観察  
 した。細胞の変性が 50% 以上のものを (+), 50  
 % 未満のものを (-) と判定した。なお、各サン  
 プルにつき 4 個の well を使用した。判定して  
 得たデータより Reed-Muench 法<sup>24)</sup> により、7 50%  
 阻止濃度を計算した。また、各実験ごとと同

時に標準インターフェロン(ここでは、Enzo-biochem 社, USA, IFN( $\alpha$  &  $\beta$ ), Cat.No.EAB-470 を用いた)を使用し、単位はすべて国際単位(International unit, IU)で表わした。

### 9. プロスタグランジンE (PGE) の定量

[ $^3$ H]-Prostaglandin E Radioimmunoassay Kit (Clinical assays Inc., Cat.No.CA-501, USA) を使用した。このキットは、PGE<sub>1</sub> および PGE<sub>2</sub> をアルカリ処理によって、それぞれ PGB<sub>1</sub> および PGB<sub>2</sub> に変え、PGB<sub>1</sub> に対する抗体を用いて測定するもの<sup>25)</sup>、PGB<sub>1</sub> については100%測定できるが PGB<sub>2</sub> については抗体の交叉反応性が約30%であることから、PGE<sub>1</sub> を中心に測定することになる。

### 10. インターロイキン 2 (IL-2) の定量

#### (1) Co-stimulator assay (図3)

Shaw ら<sup>25)</sup>の Co-stimulator assay の変法<sup>26)</sup>を用いた。すなわち、3-4週令のマウスより胸腺を摘出し、メッシュを用いてすりつぶして、RPMI 1640 培養液(10%FCS)に浮遊させ、debris を

除去した後、細胞数を  $20 \times 10^6 / \text{ml}$  に調整した。  
この胸腺細胞浮遊液  $50 \mu\text{l}$ 、サンプル  $100 \mu\text{l}$   
および  $1 \mu\text{g}$  Concanavalin A (Con A, Sigma chemical Co.,  $1.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ )  
 $50 \mu\text{l}$  を 96 穴の平底プレート の各 well に加え。  
37°C, 5%  $\text{CO}_2$  培養器で培養し、48 時間後に  
[ $^3\text{H}$ ]-thymidine (specific activity;  $8.3 \text{mCi}/\text{mg}$ , Amersham,  
England) を各 well に  $1 \mu\text{Ci}$  ずつ加え、さらに 24  
時間培養した。培養後、Automatic multiple cell  
harvester (LM-101 ラボマッシュ, ラボサイエ  
ンス, 東京) を用いて細胞を glass fiber filter  
(ラボサイエンス, 東京) 上に採取した。こ  
の filter を乾燥後、シンチレーションバイア  
ルに入れ、 $10 \text{ml}$  のシンチレーター液を加えて  
Liquid scintillation counter (LKB 1215RACKBETA, Finland)  
により放射活性 (cpm) を測定した。

## (2) IL-2 標準品の作製

5 週令のマウス 10 匹より脾臓を摘出し、脾  
細胞を採取した。それを Gey's solution を用いて  
低張処理を行い、赤血球を除去したのち、  
Hank's balanced salt solution (HBSS) で洗浄し、Con A

5  $5 \mu\text{g/ml}$  を含む RPMI1640 培養液 (10% FCS  
 2-mercaptoethanol  $5 \times 10^{-6} \text{M}$ , HEPES 10mM を添加) で  
 $4 \times 10^6$  個/ml に調整し、 $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培養  
 器で15時間培養した。培養後、 $15,000 \times g$  で  
 30分間遠沈して、上清を採取した。この上清  
 をミリポアフィルター ( $0.22 \mu\text{m}$ ) にて濾過滅  
 菌し、 $-20^\circ\text{C}$  で保存した。

### (3) 単位の決定

(2) で作製した標準品を  $100 \text{ unit/ml}$  と定めた。  
 IL-2 assay の際には、この標準品の2倍の段階  
 希釈液を用意し ( $2^0 \sim 2^{-5}$  の6種類), cpm  
 を測定して、図4のような標準曲線をつく  
 った。同時に測定したサンプルの cpm と標準曲  
 線から、サンプルの力価を求めた。

### 11. In vitro での二次刺激による CTL の誘導 (図5)

MMC-Meth A 接種後3日目のマウスより脾リン  
 パ球を採取した。これを RPMI 1640 培養液 (10%  
 FCS) で  $5 \times 10^6 / \text{ml}$  に調整し、その  $0.1 \text{ ml}$  を丸  
 底の microculture plate の各 well に加えた。さら

に、MMC-Meth A または Cryo-Meth A を  $1 \times 10^4$  個/0.1 ml  
 が加え、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養器で5日間、培  
 養し刺激した。5日後に、上清の0.1 ml を吸  
 31 取除去し、そこに $^{51}\text{Cr}$  でラベルした Meth A  
 5  $1 \times 10^4$  /0.1 ml を加え、12時間培養して、CTL  
 活性の測定を行った。

## 12. 抗体処理

### (1) 抗アシアロ GM1 抗体<sup>27) 28)</sup>

NK 細胞の除去には、ウサギ抗アシアロ GM1  
 10 抗血清 (和光純薬, 大阪) とモルモット補体  
 ( Cedarlane, Cat.No. CL5000, Canada ) を用いた。  
 抗アシアロ GM1 抗血清は、10 mg/vial を PBS(-)  
 1 ml で溶解し、補体は PBS(-) 10 ml/vial で溶解  
 した後、一定濃度になるように RPMI 1640 培養  
 15 液で希釈して使用した。常法に従って採取し  
 た脾リンパ球を RPMI 1640 培養液 (10% FCS) で  
 $1 \times 10^7$  個/ml に調整し、これに抗アシアロ GM1  
 抗血清を 1 : 100 の濃度で  $4^\circ\text{C}$ 、30分間作用  
 させたのち洗浄し、次に RPMI 1640 培養液で5  
 倍に希釈したモルモットの補体 2 ml 中で  $37^\circ\text{C}$ 、



30分間インキュベートした。この細胞を培養液で3回洗浄後、実験に用いた。

(2) 抗Lyt-1,2抗体および抗Lyt-2,2抗体

両抗体 (Cedarlane, Cat. No. CL8912-A & CL8922, Canada) とも、1 ml/vial の蒸留水を加え溶解した。通法に従って採取したリンパ球を RPMI 1640 培養液 (10%FCS) で  $1 \times 10^7$  個/ml に調整し、これに抗体を 1:20 の濃度となるように加え、4°C で 60分間インキュベートした。遠沈して上清を除去したのち、ウサギ補体 (Cedarlane, Cat. No. CL3115, Canada) を希釈して加え、37°C で 60分間インキュベートした。この細胞を RPMI 1640 培養液で3回洗浄し、実験に用いた。

なお、各実験において、グループ間の平均値の差の比較には、Student's t test を用いた。

## 結 果

1. MMC-Meth A , Cryo-Meth A 接種後の NK 活性と CTL の変動

5 MMC- および Cryo-Meth A の  $1 \times 10^6$  個相当量を マウス腹腔内に接種し、3、7および14日目の NK 活性と CTL 活性を測定した。NK 活性は図6に示すように、MMC 群、Cryo 群ともに接種後3日目は一過性の上昇があるが、MMC 10 群では以後低下し、ほとんど0に近いレベルになるのに対し、Cryo 群では14日目に非常に高い NK 活性が出現した。また、CTL 活性は図7の如く、MMC 群では接種後7日目頃から出現し始め、以後徐々に増大するの比べ、15 Cryo 群ではほとんど誘導できなかった。

次に、MMC-Meth A 接種後3日目にさらに Cryo-Meth A を接種し、NK , CTL の出現にどのような影響があらわれるかを調べた。その結果は図8及び図9の通りである。3日目以降低下を続けた MMC 群の NK 活性は、Cryo-Meth A を接

種することにより、7日目頃から上昇し始め、21日目には高いNK活性が出現した。これは、Cryo-Meth A接種群14日目の高NK活性と同程度であった。一方、CTLについては、本来ならば7日目頃より出現していたところが、Cryo-Meth A接種によりその誘導は完全に抑制された。

以上のように、MMC群とCryo群とでは、NKとCTLの出現の様相が全く異なることがわかり、さらにはCryo-Meth AはMMC-Meth AによるCTLの誘導を抑制するような機序を作動させる可能性のあることが示唆された。そこで、MMC群およびCryo群でのNK、CTLの変動の違いがどのような機序によるものかを検討した。

## 2. リンパ球のインターフェロン産生能と血中インターフェロン濃度の測定

MMC- またはCryo-Meth A 接種後、7、10および14日目のマウスから、心臓穿刺により採血（ヘパリン添加）し、この血液を遠心分離して血清を採取した。また、同時に同じマウ

スから常法に従って脾細胞を採取し、 $3 \times 10^7$  / 10 ml に調整して、プラスチックシャーレに入れ、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養器で24~36時間培養し、上清を採取した。これらの血清と培養上清に含まれる IFN 活性を測定した。なお、後述の PGE および IL-2 の定量にも同じサンプルを用いた。

IFN 活性測定の結果は、図10に示す。リンパ球培養上清中の IFN 活性、すなわち脾細胞の IFN 産生能は、MMC 群ではほとんど認められなもののに対し、Cryo 群では接種後10日目のリンパ球が高い IFN 産生能を有していた。また、血中の IFN 濃度は MMC 群では7日目以降低下してほとんど存在しなくなるが、Cryo 群では減少傾向にあるものの実験期間中は比較的高いレベルを維持していた。

### 3. インターフェロン投与による NK 活性の変化

実験結果2でみられた Cryo-Meth A 接種後10日目の高い IFN 産生能が、14日目の高 NK 活性

の出現につながるかどうかを次のような方法により調べた。すなわち、IFN ( $\alpha$  &  $\beta$ ) (Enzo-biochem, USA) 100 ユニットをマウス腹腔内に投与し、3日後にNK活性を測定した。その結果は図11の如く、IFN投与群では対照群(非投与群)に比してNK活性の増強が認められ、しかもその大きさはCryo-Meth A接種後14日目のそれと同程度であった(Stimulation Index (S.I.) は、Cryo-Meth A接種後14日目では3.2、IFN投与後3日目では3.5であった)。

以上より、Cryo群14日目の高NK活性にはIFNが関与している可能性が高いと思われる。

#### 4. In vitro での腫瘍細胞の刺激による脾細胞のIFN産生能

Cryo-Meth AのIFN誘導能を調べる目的で、正常マウスの脾細胞をin vitroでMMCまたはCryo-Meth Aを用いて刺激した後のIFN産生能を調べた。

すなわち、正常マウスの脾細胞をRPMI1640培養液(10%FCS)で $3 \times 10^7 / 10 \text{ ml}$ に調整して7 $^\circ$ ラ

スチックシャーレに移し、そこには MMC-Meth A または Cryo-Meth A  $3 \times 10^6$ 個を加え、一定時間培養した。培養上清を採取し、それに含まれる IFN 活性を測定した(図 20)。Cryo 群では 48 時間の培養上清中に著明な IFN 活性が存在し、Cryo-Meth A は IFN inducer としての働きをもつことが示された。一方、MMC 群では IFN 産生は低く、control に比して有意な差はみられなかった。

#### 5. インターフェロンの type について

Cryo-Meth A によって誘導される IFN の type を pH 2 に対する安定性をもとに検討した。一般に type I インターフェロン ( $\alpha$  または  $\beta$  型) は pH 2 に対して安定であるが、type II インターフェロン ( $\gamma$  型) は不安定で不活化されることが知られている。そこで、Cryo-Meth A 接種後 10 日目の脾細胞の 48 時間の培養上清をサンプルとし、pH 2 で処理して処理前後の IFN 活性の変化を調べた。図 13 に示すように、pH 2 処理後も処理前の約 90% の活性が残存しており、Cryo-Meth A 接種後に誘導される IFN は、

type I (α または β 型) であると考えられる。

## 6. プロスタグランディン E (PGE) の定量

実験結果 2. で用いたものと同じの血清と培養上清に含まれる PGE の活性を測定した。図 14 に PGE の血中濃度と産生能を示す。MMC 群も Cryo 群もともによく似たパターンを示すが、常に Cryo 群の方が大きな値であった。この結果は、NK 活性の高い Cryo 群の方が NK 抑制作用を持つ PGE 濃度も高いことになり、一見矛盾するように思われる。そこで、PGE の合成阻害剤であるインドメタシンを投与し、PGE と NK 活性の変化を調べた。

## 7. インドメタシン投与による NK 活性と PGE の変化

MMC- または Cryo-Meth A 接種後 3 日目にマウス 1 匹あたりインドメタシン (Sigma chemical, USA)  $1 \times 10^{-6} M$  を腹腔内に投与し、7 日目と 14 日目に PGE および NK 活性を測定した。図 15・16 に示すように、インドメタシン投与により PGE の出現は、ほぼ完全に抑制され、また NK 活

性は MMC 群<sup>7</sup>では上昇し、Cryo 群<sup>7</sup>ではさらに増強が認められた。

このことから、PGE は MMC-および Cryo-Meth A を接種すると産生され、程度の差はあるが両群の NK 活性の抑制に大きく関与していると考えられる。

ところで、IFN と PGE の出現の様相をみると、産生能に関しては PGE が 7 日目と 14 日目に高く、IFN は 10 日目に高い。また、血中濃度についても、7 日目は両者とも高値を示すが、10 日目から 14 日目にかけては、IFN は減少するのに対し PGE は増大する。このように

PGE と IFN は逆の出現パターンを示すことから、両者の間に何らかの相互作用のあることが示唆される。また、PGE は直接 NK 細胞に作用し、その活性を抑制するのみならず、

IFN の産生を抑え、その結果 NK 活性の抑制が起こる可能性も考えられる。そこで次に、PGE と IFN の相互作用について調べた。

8. IFN に対する PGE の作用



まず、PGE (E<sub>1</sub>およびE<sub>2</sub>)がIFNの産生能にどのような影響をおよぼすかを調べた。

Cryo-Meth A接種後10日目のマウスより採取した脾細胞  $3 \times 10^7$  個/ml の培養液中に PGE (E<sub>1</sub> または E<sub>2</sub>) (Sigma chemical, USA) を 1000pg/ml, 5000pg/ml

または 1  $\mu$ g/ml の割合で加え、24時間培養後の上清中に含まれる IFN 活性を測定し、IFN 産生能におよぼす PGE の影響を調べた。図17のように、PGE<sub>1</sub> および PGE<sub>2</sub> は濃度依存性に IFN の産生を妨げることが示された。

次に、IFN と PGE (E<sub>1</sub> および E<sub>2</sub>) の同時投与の効果調べた。これは、正常マウスに IFN ( $\alpha$  &  $\beta$ ) 100 ユニット および PGE<sub>1</sub> または PGE<sub>2</sub> 1000pg/ml を単独または同時投与し、24時間後の脾臓における NK 活性を調べた。IFN と PGE (E<sub>1</sub> または E<sub>2</sub>) を同時投与すると IFN 単独に比べ、NK 活性が大きく抑制された(図18)。

以上より、PGE は NK 細胞に対しては直接の抑制作用だけでなく、IFN の産生を抑えたり、また詳しい機序は不明であるが IFN の作

用を妨げるという3つの経路のあり可能性も考えられる。

## 9. Cryo 群の CTL 誘導の阻害について

### — in vitro での検索

CTL については、in vivo の実験から図7と9のように、Cryo 群では全く誘導できず、また出現するはずの CTL をも抑制した。これを図5の方法で in vitro において検索した。その結果は図19に示すが、MMC-Meth A で二次刺激した場合に比べ、Cryo-Meth A で二次刺激した場合は、CTL の誘導が強く抑制された。MMC-Meth A 接種後3日目のマウスには、感作を受け CTL へ分化する前段階の細胞 pre CTL が存在していると考えられるが、Cryo-Meth A と混合培養することにより、その分化が妨げられたと言える。すなわち、Cryo-Meth A は、① CTL を誘導できない、② pre CTL から CTL への分化を妨げるという2つの特徴をもちことが示された。このような作用を持つものとして、サポレツサ—T細胞の関与が考えられる。

## 10. サフレッサー-T細胞の検索

MMC-Meth A 接種後10日目のマウスおよび Cryo-Meth A 接種後3日目と10日目のマウスより脾臓リンパ球を採取し、次のように混合培養した。

a) MMC 群10日目のリンパ球 ( $2 \times 10^7 / 10 \text{ml}$ )

b) MMC 群10日目のリンパ球 ( $2 \times 10^7 / 10 \text{ml}$ )

+ Cryo 群3日目のリンパ球 ( $2 \times 10^7 / 10 \text{ml}$ )

c) MMC 群10日目のリンパ球 ( $2 \times 10^7 / 10 \text{ml}$ )

+ Cryo 群10日目のリンパ球 ( $2 \times 10^7 / 10 \text{ml}$ )

これらを、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  中で3日間培養後、CTL 活性を測定した。図20-1の如く、

Cryo-Meth A 接種後3日目のマウスのリンパ球を加えても CTL の誘導に著変はないが、図20-

2の如く Cryo-Meth A 接種後10日目のリンパ球を加えることにより、CTL の誘導は半減した。

すなわち、Cryo-Meth A 接種後10日目には、CTL の発現を抑える細胞いわゆるサフレッサー-T細胞様の活性を持った細胞が存在していることが示唆された。そこで、Cryo 群10日目のリンパ球を抗  $\text{Lyt}$  抗体で処理してから加え、培

養し、CTL 活性を調べた。図 20-2 に示すよ  
 うに、抗 Lyt-1,2 抗体で処理をしても CTL 誘  
 導の抑制は消失しないが、抗 Lyt-2,2 抗体で  
 処理をすることにより、CTL 誘導の抑制は消  
 失した。以上の結果より、Cryo-Meth A 接種後 10  
 日目には、Lyt-1<sup>-</sup>, 2<sup>+</sup> の phenotype <sup>29~32)</sup> をもつサ  
 プレッサー T 細胞の存在することが示された。

### 11. Cryo-Meth A と Cyclophosphamide (CY) の併用による延命効果

臨床的な興味から、抗癌剤の中でサプレッ  
 サー T 細胞の出現を抑制する効果のあること  
 が知られているシクロフォスファミド (Endoxan,  
 シオノギ製薬, 大阪) <sup>33~37)</sup> を併用すること  
 により延命効果が得られるか否かを調べた。

実験スケジュールは、図 21 の通りである。

Cryo-Meth A 単独接種群では、100 万個相当量を  
 接種後、3, 14 および 21 日目に Meth A の生細  
 胞 100 万個を腹腔内に移植し、移植日からの  
 生存日数を調べた。CY 併用群では、CY  
 50mg/kg body weight を腹腔内に投与した翌日に

Cryo-Meth A を接種し、その日から14および21日目に Meth A を100万個移植して生存日数を調べた(図22)。Meth A  $1 \times 10^6$ 個を正常マウスの腹腔内に移植すると、生存日数は12.6日であった。Cryo-Meth A 単独接種群では3、14および21日目に移植するとそれぞれ、14.3、13.5 および15.0日と延命効果は認められないが、CY 併用群で21日目に移植した場合には、19.3日と有意な延命効果が得られた。

## 12. インターロイキン2 (IL-2) の関与

実験結果2で用いたものと同一の血清と培養上清を用いてIL-2 活性の測定を行ない、CTL 誘導への関与を調べた。その結果、図23のような出現パターンが得られた。MMC 群では、7日目から14日目にかけて急激にIL-2 産生能が高まるのが認められた。

## 13. IL-2 投与の CTL, NK 活性におよぼす影響

IL-2 は、CTL 誘導において非常に重要な役割を果たす<sup>38~41)</sup>。また、NK 細胞に対する増強因子としても注目されている<sup>42~44)</sup>。ここ

では、マウスに MMC-Meth A または Cryo-Meth A を接種後 10 日目に IL-2 を投与し、14 日目の CTL と NK 活性の変化を調べた。使用した IL-2 はヒト由来のもの (ENI 社, USA) で、その 100 ユニットをマウス腹腔内に投与した。

CTL の誘導は図 24 のように MMC 群では増強が認められたが、Cryo 群では全くその効果が見られなかった。

一方、NK 活性については図 25 のように、IL-2 を投与した場合には、MMC-Meth A や Cryo-Meth A の接種の有無にかかわらず若干の増強を認められたが、Cryo 群では S.I. で比較すると IL-2 を投与した場合が 1.7、投与しない場合が 3.2 で、むしろ減弱の傾向がみられた。

このことから、Cryo 群のリンパ球は、IL-2 を有効に利用できないか、あるいは IL-2 に反応しない状態になっている可能性が示唆される。その確認のため、次の IL-2 消費試験を行った。

## 14. IL-2 消費試験

リンパ球の IL-2 消費能を次のような方法により調べた。MMC- または Cryo-Meth A 接種後 14 日目のマウスより脾臓リンパ球を採取し、これを 50 ユニットの IL-2 を含む RPMI1640 培養液 (10%FCS) または IL-2 を含まない培養液で  $1 \times 10^7$  個 / 5 ml に調整し、24 時間  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  中でインキュベートした後、上清中の IL-2 活性を測定した。結果は表 1 に示す。IL-2 を含まない培養液を用いたグループは、その値が IL-2 の産生能を示すことになる。Cryo 群では、リンパ球の IL-2 産生は 0 であつたが、IL-2 消費能はかなり高い。一方、MMC 群では 24 ユニットの産生があり、また IL-2 を加えたグループでは 50 ユニットと最初に加えた量がそのまま残存しているが、このグループにおいても 24 ユニット前後の産生があると思われるので、おそらく MMC 群のリンパ球は IL-2 を産生しながら使用するという状態であると考えられる。また、この培養後のリンパ球をとり、CTL

活性を調べたのが図26である。MMC群では、IL-2処理により約3倍の増強がみられるが、Cryo群ではその程度は低い。

5 以上より、Cryo群ではIL-2を消費するが、それがCTLやNK細胞の誘導・増強には利用されていることが示唆された。

15. CTL誘導におけるマクロファージの作用  
CTLの誘導には、マクロファージの作用が不可欠である。MMC-またはCryo-Meth A接種後のマウスのMφのCTL誘導能について調べた。すなわち、図5の方法と同様に、in vitroで二次刺激をしたが、被刺激細胞にはMMC-Meth A接種後3日目のマウスの脾細胞（付着細胞：非付着細胞=1:3）を用い、脾リンパ球を用いた場合と比較した。5日間の培養後、CTL活性の測定を行なったところ図27のように、MMC群ではCTL誘導はMφ等の付着細胞の有無に影響されなかったが、Cryo群ではMφを加えることによりCTLの誘導が可能になった。なお、このときのMφは、Meth Aに打ちやす細胞



障害活性をほとんど示さなかった。

次に、正常マウスのMφとCryo-Meth A接種マウスのMφのCTL誘導能を比較した。これは、Cryo-Meth A接種後14日目のマウスのリンパ球とマクロファージ、または正常マウスのリンパ球とマクロファージをRPMI1640培養液(10%FCS)で、リンパ球は $2 \times 10^7 / \text{ml}$ 、Mφは $1 \times 10^7 / \text{ml}$ に調整してシャーレに移し、リンパ球のみまたはリンパ球とMφを2:1の割合で加之、さらにMMC-Meth A  $1 \times 10^6 / \text{ml}$ を加之、 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 中で5日間インキュベートし、CTL活性を測定した。図28-(1)の如く、Cryo-Meth A接種マウスのリンパ球を用いた場合は、Mφのない場合よりもMφを加えた場合の方がCTL誘導は強く起こるが、Cryo群のMφよりも正常マウスのMφを加える方がCTL誘導は強くなる。また、正常マウスのリンパ球を用いた場合においても図28-(2)に示すように、Cryo群のMφよりも正常Mφの方がCTLをよく誘導した。すなわち、Cryo群のMφはCTL

を誘導する能力を保持しているが、その能力は正常状態よりも幾分低下していることが示された。

以上の結果をもとに免疫細胞間の相互作用を図29-(1), (2)にまとめた。

## 考 察

Burnet <sup>(45) (46)</sup> が癌に対する免疫監視機構の存在をとり之て以来、癌の発生や成長の抑制に免疫が大きく関与することが報告されてきた。しかし一方で、これに反対する報告<sup>(47)</sup>もあり、癌に対する免疫応答の複雑さを物語っている。

癌に対する免疫応答は、癌細胞のもつ抗原いわゆる腫瘍特異抗原や腫瘍関連抗原<sup>(48) (49)</sup>の存在が前提となるが、これらの抗原性は通常、細菌などの抗原に比べると極めて弱いこと、また担癌宿主においては非担癌宿主に比べ免疫能が低下していること<sup>(50) (51)</sup>、および免疫反応を抑制する細胞や因子が出現すること<sup>(52-54)</sup>などから、癌に対する強い免疫応答の誘導は極めて困難であると考えられる。これら諸問題を解決することが腫瘍免疫の発現や増強につながると思われるが、現在のところ臨床においては、主として非特異的な方法で宿主の免疫能を回復させ、さらには高めよう

とする手段が中心になっている。

それに対し、癌細胞のもつ低い抗原性を高め、免疫細胞による癌抗原の認識を容易にする手段の一つとして期待されるのが、Cryosurgery<sup>5</sup>である。すなわち、腫瘍細胞を凍結破壊することにより、膜抗原や細胞内物質の大量流出が起こり、免疫細胞による認識を容易ならしめるという考え方である。また、凍結により細胞成分の変性が起こり、これが抗原性の増強<sup>10</sup>につながるという可能性も考えられる。

これまでにも、Cryosurgery が体液性免疫や細胞性免疫の発現に影響を及ぼすという報告<sup>4) 11~15) 55~58)</sup> および動物実験や臨床における実際の効果<sup>9) 12) 59~63)</sup> についての報告はみられるが、免疫細胞個々についての解析や免疫応答の機序<sup>15</sup> について調べた報告は少ない。

本研究は、凍結破壊した腫瘍細胞によつて誘導される細胞性免疫を特異的 (CTL) および非特異的 (NK) の両面から調べ、その消長の機序をリンファイン等の可溶性因子と免疫

細胞の相互作用を中心に解析しようと試みたものである。

細胞の凍結には、破壊と保存という全く違った二つの作用があるため、破壊を行なうにはそれに適した凍結条件<sup>64)65)</sup>を設定しなければならぬ。一般に、細胞の破壊には $-60^{\circ}\text{C}$ 以下の温度が必要であると言われている。また、凍結融解の速度も重要であり、急速凍結(毎分 $100^{\circ}\text{C}$ 前後)・緩徐融解(毎分 $1\sim 10^{\circ}\text{C}$ 程度)により最大の破壊効果が得られると言われている。本実験では、凍結温度を $-60^{\circ}\text{C}$ とし、凍結融解の速度はほぼ上述の通りとした。組織の破壊を確実にするためには凍結融解を2~3回反復して行なうことが必要とされているが、上記条件では1回で100%の細胞破壊が得られたため、凍結融解は1回のだけとした。

凍結破壊した細胞と対比するためには、マイトマイシンCで処理した腫瘍細胞も用いた。本来ならば、無処置の腫瘍細胞を対照とする

のが適当であるが、Meth A はその 100 万個を腹腔内に移植すると生存日数が 12 日前後と短く、免疫応答の経時的な変化を充分に追求できないため、MMC で処理して増殖能を失わせたものを用いた。また、本実験では、担癌動物の腫瘍に直接 cryosurgery を施行するという方法をとっていないが、これは凍結破壊細胞の効果、すなわち抗原性の有無をみることを目的としており、担癌による免疫能の低下という因子を除去したからである。

今回は、非特異的細胞性免疫の指標として NK 活性を調べた。現在のところ、cryosurgery 後の NK 活性を調べた報告は極めて少ない。

NK 活性については、MMC 群・Cryo 群ともに接種後 3 日目に同程度の上昇がみられたが、これは異物抗原の侵入により一過性に刺激されたもので、抗原の種類には大きく依存しないものと考えられる。両群間の差は、7 日目以降に明確にあらわれた。MMC 群では低下するのに対し、Cryo 群では 14 日目にコントロール（

正常マウス)に比し、約3倍のNK活性が出現した。今回はデータを示していないが、

C3H/HeN マウスと MH134 腹水肝癌、および

C57B1/6 マウスと Lewis lung carcinoma(3LL)などの

5 他の系においても同様の結果が得られている。

NK活性の増強・抑制には、腫瘍細胞や細菌などの抗原の他にも様々なfactorが関与して

いる。増強については、なかでもインターフ

エロン(IFN)に関する報告が多く、NK活

10 性増強因子として最も強力なものとされている。

Cryo群でのNK活性の増強は、Cryo-Meth A接種後14日目に起こることから、抗原がある

Cryo-Meth Aの直接作用とは考えにくく、Cryo-Meth A

15 接種により何らかの免疫経路(NK活性増強経路)が賦活され、その結果NK活性の増強

をみたと考えるのが妥当である。そのような

NK活性を増強させる経路の一つとして第一

に挙げられるのが、IFNを介する経路である(66~70)。

血中の IFN 濃度や脾細胞の IFN 産生能を調べてみると、Cryo 群は MMC 群に比べて著明に高く、また in vitro の実験 (図 12) から、Cryo-Meth A に IFN 誘導能のあることは明白である。IFN が NK 細胞を活性化する kinetics については、NK 活性化の程度が IFN の用量に依存すること、またその上昇は投与後 48 時間までにもとのレベルに戻るなど報告されている<sup>71)</sup>。本実験での IFN 産生の kinetics および血中濃度の変動をみると、IFN 産生の多い時期 (10 ~ 11 日目) より 4 日後に最大の NK 活性が得られている。しかし、IFN ( $\alpha$  &  $\beta$ ) 100 ユニットをマウス腹腔内に投与し、その 3 日後の NK 活性を測定したところ、IFN 投与群は非投与群の約 3 倍の活性増強を示し、これは Cryo-Meth A 接種後 14 日目の NK 活性の増強と同程度であることから、10 日目の IFN 産生の急激な上昇が 14 日目の NK 活性の増強に関与している可能性は高いと考えられる。なお、Cryo-Meth A 接種後 10 日目にリンパ球の IFN



産生能が上昇する機序については、現在のところ不明である。

Cryo-Meth A が誘導する IFN は、pH 2 に対する安定性から type I (α または β 型) であると考えられる。IFN β の主たる産生細胞は線維芽細胞 (fibroblast) であり、本実験では fibroblast の関与を除外できることから、IFN α が誘導されたと考えられる問題ないと思われる。

Trinchieri ら<sup>72)</sup> は、ヒト末梢血リンパ球を分画し、腫瘍細胞やヘルペスウイルスなどで刺激したところ、Null 細胞分画の細胞が著明な IFN 産生能を有していたことを認めた。その他にも、NK 細胞が IFN を産生するという証拠が得られている<sup>73)74)</sup>。

この系においても NK 細胞が自ら IFN α を産生し、NK 前駆細胞からの NK 細胞の分化誘導や自らの活性増強に利用している可能性は高いと思われる。湊ら<sup>66)</sup> は、NK 細胞が免疫学的特異受容体 (VH 遺伝子産物) を持っていることや刺激後の IFN 産生の kinetics

から、IFN の産生において、種々の腫瘍細胞  
やウイルス感染細胞が免疫学的な意味で「抗  
原」として認識されているとは考之にくいと  
述べている。この考之に沿うならば、Cryo-Meth A  
は、NK 細胞によって「抗原」として認識さ  
れたのではなく、凍結破壊された細胞の成分  
がいわば、poly I:C のような化学物質の IFN  
inducer と同じような働きをしたにすぎないと  
言える。MMC-Meth A にこのような作用のないこ  
と、また本文では報告していないが、ホモジ  
ナイズした Meth A では大きな NK 活性が誘導  
できないうことから、凍結処置によって変性し  
た細胞成分が IFN の誘導に関与していると思  
われる。すなわち、cryosurgery 後の NK 活性の  
増強は、凍結処置による腫瘍の抗原性の増強  
の証明にはならないと考之ている。

次に、MMC 群における NK 活性の抑制の原  
因について調べた。NK 活性の抑制を起す  
物質については多数報告されているが、  
Corynebacterium parvum や腫瘍細胞では、その

NK 活性の抑制がプロスタグランディン産生の増加によると報告されている<sup>75) 76)</sup>。プロスタグランディンは、様々な免疫反応、たとえばリンパ球の増殖、抗体産生、リンフォカイ

5 ン産生およびTリンパ球やマクロファージによる細胞障害活性を抑制するなど、ほとんどの報告が免疫系に対して抑制的に作用すると述べている<sup>77) 78)</sup>。そこで、本実験系における

PGE の関与について調べた。なお、ここで用

10 いたクリニカル・アッセイ社のキットは、前述のようにPGE<sub>1</sub>を中心に測定するものである。PGE<sub>1</sub>の免疫系におよぼす影響<sup>79)</sup>については、

PGE<sub>2</sub><sup>78)</sup>ほど多数の報告はないが、おおむね

PGE<sub>2</sub>と同様の作用があるとされている。

15 MMC 群でのNK活性の低下は、PGEの合成阻害剤であるインドメタシンを用いた実験(図16)からPGEによることは明らかであるが、高NK活性を示すCryo群においてもMMC群以上にPGEが抑制的に作用していることが判明した。

Cryo 群での高 NK 活性は、IFN の増強効果と PGE の抑制効果の和の結果であり、インドメタシン投与で PGE の関与を除去することにより、IFN のみの効果があらわれたと考えられる。また、PGE<sub>1</sub> または PGE<sub>2</sub> と IFN を混合してマウスに投与し、NK 活性の変化を調べたところ (図 18)、IFN 単独投与に比べて活性の増強は有意に低かったことから、IFN と PGE (E<sub>1</sub> および E<sub>2</sub>) がそれぞれ別々に作用する以外に PGE (E<sub>1</sub> および E<sub>2</sub>) が IFN の作用を妨害するような機序の存在が示唆されるが、これについてはさらに検討が必要であり断定的なことは言えない。また、インドメタシン投与群と非投与群の NK 活性出現の kinetics の比較から、Cryo-Meth A 接種後 10 日目に高い IFN 産生能が観察されるのは、10 日目までは PGE が IFN 産生を抑制しているためでありと考えられる。実際、リンパ球の培養液中に PGE<sub>1</sub> または PGE<sub>2</sub> を加えると、IFN の産生が抑制された (図 17)。

一般に、PGE の NK 活性抑制作用は、NK 細胞に対する直接の作用であると考えられるが、上述の如く IFN の産生を抑制したり、IFN の作用を妨害するという別の機序の存在も示唆された。

以上のように、NK 活性の誘導については Cryo-Meth A はその IFN 誘導能の中之に有利であることが示された。

次に、凍結免疫療法の本来の目的である特異的な免疫の誘導すなわち CTL の誘導について検討する。

CTL の誘導については図7と図9の通り Cryo-Meth A が極めて不利であることを示す結果が得られた。Cryo-Meth A は、それ自身が CTL を誘導できないだけでなく、pre CTL から CTL への分化をも妨げることから、サプレッサー活性をもつ細胞や因子の出現が考えられる。

サプレッサー細胞については、本実験系では、Lyt-1<sup>-</sup>, 2<sup>+</sup> の phenotype をもつサプレッサー T 細胞の存在が確認された。

一般に、腫瘍細胞自身がその腫瘍抗原に特異的な免疫反応を抑制するサブレッサー-T細胞を誘導することが証明されており<sup>53)</sup>、また液性の免疫抑制物質の出現<sup>80)</sup>も報告されている。MMC 群においても CTL 活性がたかたか10%程度であることから、サブレッサー-T細胞を誘導している可能性は充分にあると思われる。

さて、Cryo 群ではサブレッサー-T細胞の誘導されることが明らかになったが、MMC-Meth A と Cryo-Meth A のサブレッサー-T細胞誘導能の違いは何に起因するものであろうかという疑問が生じる。

Yamauchi ら<sup>81)</sup>は、MMC で処理した live tumor cell でマウスを免疫すると、CTL が誘導されるのに対し、3M KCl で抽出した可溶性抗原で免疫したマウスではサブレッサー-T細胞が誘導されることを確認し、CTL とサブレッサー-T細胞とは認識する抗原の違い、すなわち CTL は live tumor cell の膜上の self antigen

を認識し、サプレッサーT細胞は細胞内物質  
などの soluble tumor antigen を認識すると述べて  
いる。また、Bertschmann ら<sup>82)</sup>は MMC で処理し  
た腫瘍細胞、破壊した腫瘍細胞の粗製膜調整  
物およびそれを sodium deoxycholate で可溶化し  
たものを用いて、CTL とサプレッサーT細胞  
の誘導能を調べたところ、MMC 処理した腫瘍  
細胞は CTL を誘導したのに対し、他の2者は  
サプレッサーT細胞の誘導能が高かったと述  
べている。すなわち、CTL の誘導には正常な  
(変性・破壊を受けていない)膜抗原が必要  
で、細胞内物質や破砕した膜およびその抽出  
物はむしろサプレッサーT細胞の活性化経路  
を賦活すると言えらる。これらを考慮すると、  
凍結破壊した腫瘍細胞は、いわば"破砕された  
細胞膜と細胞内物質の混合物であり、サプレ  
ッサーT細胞の強力な inducer になりうると考  
えられる。

抑制因子の出現については、現在までに様  
々な免疫抑制物質が報告<sup>83) 84)</sup>されており、そ

の中には奥体の明らかになっ、ていないものも  
 多い。一方、既知のものとしては前述の PGE  
 (E<sub>1</sub> および E<sub>2</sub>) が挙げられる。PGE<sub>2</sub> にサブレ  
 ッサー T 細胞誘導能があり、それが PGE<sub>2</sub> の免  
 疫抑制の機序の一つであるという説がある。

事実、ヒトの単核細胞の産生する PGE<sub>2</sub> が Fcγ<sup>+</sup>  
 T cell を誘導するという報告<sup>85)</sup>や PGE<sub>2</sub> 処理を  
 したリンパ球からサブレッサー因子が放出さ  
 れるという報告<sup>86)</sup>があり、この説を裏付けて  
 いる。しかし、逆の報告<sup>87) 88)</sup> もみられ、

PGE は、NK 活性に対する場合と同様、濃度  
 等の条件により全く違った作用を為すよう  
 である。本実験系でも CTL 誘導抑制への PGE の  
 関与を調べるために Cryo-Meth A 接種マウスに図  
 16 と同様の方法でインドメタシンを投与し、  
 CTL の発現を調べたところ、14日目において  
 約5%の CTL 活性が出現した(表2)。低い  
 ながらもある程度の活性が出現したことは、  
 やはり PGE が CTL の誘導に対して抑制的に作  
 用することを示唆するものである。しかし、



5 サプレッサー T 細胞の誘導を介するかどうかの証拠は得られていない。以上のごとく、Cryo 群における CTL 誘導の失敗にはサプレッサー T 細胞の誘導や免疫抑制因子としての PGE の産生が大きく関与していると言える。

次に、CTL の分化誘導と増強に必須であるインターロイキン 2 を介する経路について調べた。IL-2 は、Mφ の産生する IL-1 の刺激を受け、ヘルパー T 細胞が産生するリンフォカインであり、CTL の誘導には欠かせないものである。Cryo 群における CTL 誘導の失敗はサプレッサー T 細胞の出現のみならず、この経路に欠陥のある可能性も高い。そこで、血中 IL-2 活性、リンパ球の IL-2 産生能と消費能および IL-2 に対する反応性を調べ、cryosurgery 後の免疫応答における IL-2 の関与を検討した。

15 IL-2 産生能については、脾細胞を用いた場合、MMC 群では 7 日目から 14 日目にかけて、飛躍的に増大し、CTL の誘導との関連をうかがわせるが、Cryo 群ではほぼ一定のレベルを

保っているように思われる。しかし、Mφ等の付着細胞を除いたリンパ球のみの fraction を用いた場合には、MMC 群では減少するものの産生能を保っているが、Cryo 群では IL-2 を全く産生しなくなつた。IL-2 の産生には Mφ またはその産生する IL-1 の存在が必要である。MMC 群において、Mφ の存在の有無にかかわらずある程度の IL-2 産生が認められたのはリンパ球を in vitro に移す前に (MMC-Meth A 接種後 14 日目までに) すでに Mφ からの IL-1 の刺激を受け、Mφ を必要としない状態になっていたものと考えられる。それに対し、Cryo 群では同じ時期でも Mφ の存在が必要であり、Mφ からのシグナルが遅れていることを示す。これは、Mφ の機能低下ないしは抗原側の欠陥を示唆するものである。

次に IL-2 消費能をみると、Cryo 群のリンパ球は MMC 群のそれと同程度あるいはそれ以上の消費が認められた。しかし、IL-2 処理後のリンパ球は Cryo 群では低い CTL 活性しか示さ

す。CTL の誘導に利用されていないことは明らかである。Susskind ら<sup>89)</sup>は、サブレッサー T 細胞の CTL 誘導抑制の機序として、サブレッサー T 細胞が IL-2 を消費するため、pre CTL が IL-2 を利用できなくなるからであると述べている。本実験においてもその可能性が示唆される。

一方、IL-2 に対する反応性をみると、図 24 と 26 のように MMC 群のリンパ球は高い反応性を示す。しかし、Cryo 群のリンパ球も IL-2 処理することにより低いながらも CTL が誘導されたことから、反応性の低下はあるものの欠如はしていないと思われる。

すなわち、IL-2 に関しては Cryo 群のリンパ球は、

(1) Mφ による IL-1 の刺激の遅延、欠如により IL-2 産生能の低下または欠如をきたす。

(2) 高い IL-2 消費能を示すが CTL の誘導には利用されていない

(3) IL-2 に対する反応性に若干の低下がある

などの特徴が認められる。

次に、Mφの機能とくにCTL誘導における働きについて、両群間の比較をした。MφはIL-1を産生してCTLの誘導に関与する一方で、PGEを産生してCTLの誘導抑制など広い免疫抑制作用を発揮する。両群のリンパ球をin vitroで二次刺激してCTLの誘導を調べると前述のごとく、Cryo群ではMφの存在が不可欠であることがわかった。そこで、CTL誘導という点においてCryo群のMφが正常状態よりも機能低下を示すか否かを調べた。その結果は図28-(1), (2)の通りで、Cryo群Mφは正常マウスのMφよりも若干の機能低下が認められたが著明な差はなく、Mφそのものの能力は大きく変化してはいないが、Cryo-Meth AはMφのIL-1産生能よりもPGE産生能を強く刺激するものと思われる。

さて、以上の考察をもとに cryosurgery の悪性腫瘍治療における有用性を検討した。

ナチュラルキラー (NK) 細胞は、種々の腫瘍細胞に対して細胞障害活性を有する細胞群で特定の抗原による刺激によらずに機能を発揮するものである。この NK 細胞が腫瘍拒絶に働いていることは、多数の報告<sup>90) 91)</sup>により明らかである。しかし、NK 細胞に対する感受性は、腫瘍細胞の種類により大きな差があり、Meth A のような NK 非感受性の腫瘍に対してはほとんど効果がなしいと言えらる。このことは、図 22 のように Cryo-Meth A を接種して14日目の高 NK 活性を示す時期に Meth A を移植してもほとんど延命効果が得られなかったことから明らかである。

しかし、実際に臨床で使用されている OK-432<sup>92)</sup> などの免疫賦活剤は NK 活性を増強させることが知られており、さらにこれらの薬剤がある程度の抗腫瘍効果をあげていることから、一概に NK 細胞の効果を否定するこ

とはできない。腫瘍の種類により cryosurgery の効果は違ってくるのが予想される。

一方、CTL については、サレンサーT細胞や PGE の出現によりその誘導が妨げられるという全く期待はずれの結果になったが、シクロフォスファミド投与でサレンサーT細胞の出現を抑えることにより延命効果が得られたことやインドメタシン投与で CTL の誘導が可能になったことから、これらの薬剤を併用することで、cryosurgery は十分に免疫療法として臨床応用が可能であると考えられる。

## 結 論

凍結破壊した腫瘍細胞をマウスに接種した後、誘導される免疫応答をナチュラルキラー細胞とキラーT細胞およびそれらに影響を及ぼす液性因子を中心に解析し、以下の結論を得た。

1) 凍結腫瘍細胞を接種することにより、NK活性の増強が認められたが、CTLは誘導できなかった。逆にMMC処理した腫瘍細胞の場合には、NK活性は低下したが、CTLの誘導が認められた。

2) 凍結腫瘍細胞は、インターフェロンのinducerとして作用し、NK活性の上昇はインターフェロン産生のkineticsとよく一致した。すなわち、凍結腫瘍細胞を接種した場合に得られる高いNK活性は、誘導されたインターフェロンによる可能性が高いと考えられる。

3) プロスタグランジンEは、MMC群、Cryo群ともにNK活性の抑制に大きく関与し

ていた。しかし、Cryo 群では MMC 群に比べ、血中 PGE 濃度および脾細胞の PGE 産生能ともに高く、NK 活性のみならず、インドメタシン投与にて CTL 誘導が部分的に回復したことから CTL 誘導の抑制にも関与している可能性が示唆された。

4) Cryo 群の脾臓リンパ球中には、サブレンサー T 細胞が出現し、CTL の誘導を強く抑制することが判明した。

5) インターロイキン 2 については、MMC 群のリンパ球は高い産生能をもち、さらにそれを有効に利用できるが、Cryo 群のリンパ球は産生能が低く、また有効に利用できないことが示された。このことは、Cryo 群においてヘルパー T 細胞 - インターロイキン 2 を介する CTL 誘導経路が十分に作動していないことを示唆する。

6) Cryo 群のマクロファージは、CTL の誘導を補助する機能を失っており、正常状態のマクロファージよりも幾分劣ると考えら



れる。

7) Cryosurgery は、サフレッサー T 細胞の誘導、インターロイキン 2 を介する経路の障害およびマクロファージの機能低下などにより 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、高い NK 活性を誘導することやサフレッサー T 細胞の誘導および PGE の産生を抑制する薬剤を併用することにより、癌免疫療法としての効果を発揮する可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えられ、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜わりました。大阪大学歯学部口腔外科学第2講座作田正義教授に深く感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、御援助、御協力をいただきました口腔外科学第2講座の教室員の皆様に深謝いたします。

- 1) Cooper, I.S. (1961): Cryothalamectomy-hypothermic congelation: a technical advance in basal ganglia. Preliminary report. J. Amer. Geriat. Soc., 9, 714-718.
- 2) Gage, A.A., Koepf, S., Wehrle, D. and Emmings, F. (1965): Cryotherapy for cancer of the lip and oral cavity. Cancer, 18, 1646-1651.
- 3) Emmings, F., Koepf, S. and Gage A.A. (1967): Cryotherapy for benign lesions of the oral cavity. J. Oral Surg., 25, 320-326.
- 4) Yantorno, C., Soanes, W.A., Godner, M.J. and Shulman, S. (1967): Studies in cryo-immunology. I. The production of antibodies to urogenital tissue in consequence of freezing treatment. Immunology, 12, 395-410.
- 5) Shulman, S., Brandt, E.J. and Yantorno, C. (1968): Studies in cryo-immunology. II. Tissue and species specificity of the auto-antibody response and comparison with iso-immunization. Immunology, 14, 149-158.
- 6) Shulman, S., Bronson, P., Riera, C.M. and Brandt, E.J. (1968): Studies in cryo-immunology. III. The immunoglobulin nature of the antibody response. Immunology, 14, 541-551.
- 7) Riera, C.M., Brandt, E.J. and Shulman, S. (1968): Studies in cryo-immunology. IV. Antibody development in rabbits after iso-immunization followed by freezing. Immunology, 15, 779-786.
- 8) Blackwood, C.E. and Cooper, I.S. (1972): Response of experimental tumor system to cryosurgery. Cryobiology, 9, 508-515.
- 9) Neel, H.B., Ketcham, A.S. and Hammond, W.G. (1973): Experimental evaluation of in situ oncoside for primary tumor therapy: comparison of tumor-specific immunity after complete excision, cryonecrosis and ligation. Laryngoscope, 83, 376-387.
- 10) 望月智行 (1981): 凍結免疫リンパ球移入による癌受動免疫療法の基礎的研究, 日本外科学会雑誌, 82, 193-202.
- 11) Shulman, S., Yantorno, C. and Bronson, P. (1967): Cryo-immunology: a method of immunization to autologous tissue. Proc. Soc. - Exp. Biol. Med., 124, 658-661.

- 12) Myers, R.S., Hammond, W.G. and Ketcham, A.S. (1969): Tumor-specific transplantation immunity after cryosurgery. *J. Surg. Oncol.*, 1, 241-246.
- 13) Bagley, D.H., Faraci, R.P., Marrone, J.C. and Beazley, R.M. (1974): Lymphocyte mediated cytotoxicity after cryosurgery of a murine sarcoma. *J. Surg. Res.*, 17, 404-406.
- 14) Faraci, R.P., Bagley, D.H., Marrone, J.C. and Beazley, R.M. (1975): In vitro demonstration of cryosurgical augmentation of tumor immunity. *Surgery*, 77, 433-438.
- 15) Bagley, D.H. and Faraci, R.P. (1978): Tumor immunity following cryosurgery or electrocauterization. *National Cancer Institute Monograph*, 49, 371-373.
- 16) Jacob, G., Li, A.K.C. and Hobbs, K.E.F. (1984): A comparison of cryodestruction with excision or infarction of an implanted tumor in rat liver. *Cryobiology*, 21, 148-156.
- 17) Jaradpour, N., Bagley, D.H. and Zbar, B. (1979): Failure of cryosurgical treatment of experimental intradermal tumors to eradicate microscopic lymph node metastasis in guinea pigs. *JNCI*, 62, 1479-1481.
- 18) Hayakawa, K., Yamashita, T., Suzuki, K., Tomita, K., Hosokawa, M., Kodama, T. and Kobayashi, H. (1982): Comparative immunological studies in rats following cryosurgery and surgical excision of 3-methylcholanthrene induced primary autochthonous tumors. *Gann*, 73, 462-469.
- 19) 辻公美 (1971): 比重遠沈法によるリンパ球の分離, *Conray-Ficoll* 法; 免疫実験操作法 (A) (日本免疫学会編). 金沢, 443-446, 昭和 46.
- 20) 安保徹 (1980): 単球の同定法・分離法・除去法; リンパ球機能検索法 (天田純一, 藤原道夫編). 1版, 中外医学社, 東京 141-153, 昭和 55.
- 21) Brunner, K.T., Mauel, J., Cerottini, J.C. and Chapuis, B. (1968): Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on  $^{51}\text{Cr}$ -labeled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*, 14, 181-196.
- 22) Havell, E.A. and Vilček, J. (1972): Production of high-titered interferon in cultures of human diploid cells. *Antimicrob. Agents. chemother.*, 2, 476-484.

- 23) 小長谷昌功, 河野晴也, 斎藤早又良(1981): インターフェロンの試験検定; インターフェロン研究の進歩(川出由己, 桑田次男, 小林茂保編), 1版, 共立出版, 東京, 355-363, 昭和56.
- 24) Reed, L.J. and Muench, H. (1938): A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27, 493; 大谷明, 黒川正身(1981): ウイルス学に必要な数値の扱い方; ウイルス実験学 総論(国立予防衛生研究所学友会編), 2版, 丸善, 東京, 479-504, 昭和56 より引用
- 25) Shaw, J., Monticone, V. and Paetkau, V. (1978): Partial purification and molecular characterization of a lymphokine (costimulator) required for the mitogenic response of mouse thymocytes in vitro. *J. Immunol.*, 120, 1967-1973.
- 26) 小中義照, 紺田進(1981): ヒトおよびマウス Interleukin 2 の作製と T cell の長期培養; 免疫実験操作法Ⅴ(日本免疫学会編), 金沢, 3383-3392, 昭和56.
- 27) Kasai, M., Iwamori, M., Nagai, Y., Okumura, K. and Tada, T. (1980): A glycolipid on the surface of mouse natural killer cell. *Eur. J. Immunol.*, 10, 175-180.
- 28) Habu, S., Fukui, H., Shimamura, K., Kasai, M., Nagai, Y., Okumura, K. and Tamaoki, N. (1981): In vivo effects of anti-asialo GM1. Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. *J. Immunol.*, 127, 34-38.
- 29) Bluestone, J.A., Lopez, C. and Hurtenbach, U. (1981): Mixed lymphocyte reactivity in spleen cells from F-9 tumor-bearing mice I. Suppressor cell induction and characterization. *Cell. Immunol.*, 62, 334-340.
- 30) Aune, T.M. and Pierce, C.W. (1982): Activation of a suppressor T-cell pathway by interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3803-3812.
- 31) Hu, S.K., Eardley, D.D., Cantor, H. and Gershon, R.K. (1983): Definition of two pathways for generation of suppressor T cell activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 3779-3781.
- 32) Gullberg, M. and Larsson, E. (1982): Studies on induction and effector functions of concanavalin A-induced suppressor cells that limit TCGF production. *J. Immunol.*, 128, 746-750.
- 33) Tagart, V.B., Thomas, W.R. and Asherson, G.L. (1978): Suppressor T cells which block the induction of cytotoxic T cells in vivo. *Immunology*, 34, 1109-1116.

- 34) Röllinghoff, M., Starzinski-Pomitz, A., Pfizenmaier, K. and Wagner, H. (1977): Cyclophosphamide-sensitive T lymphocytes suppress the in vivo generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 145, 455-459.
- 35) Glaser, M. (1979): Regulation of specific cell-mediated cytotoxic response against SV40-induced tumor associated antigens by depletion of suppressor T cells with cyclophosphamide in mice. *J. Exp. Med.*, 149, 774-779.
- 36) Mitsuoka, A., Baba, M. and Morikawa, S. (1976): Enhancement of delayed hypersensitivity by depletion of suppressor T cells with cyclophosphamide in mice. *Nature (Lond.)*, 262, 77-78.
- 37) Cowens, J.W., Ozer, H., Ehrke, M.J., Preco, W.R., Colvin, M. and Mihich, E. (1984): Inhibition of the development of suppressor cells in culture by 4-hydroperoxycyclophosphamide. *J. Immunol.*, 132, 95-100.
- 38) Wagner, H., Hardt, C., Heeg, K., Röllinghoff, M. and Pfizenmaier, K. (1980): T-cell-derived helper factor allows in vivo induction of cytotoxic T cell in nu/nu mice. *Nature*, 284, 278-280.
- 39) Mills, G.B. and Paetkau, V. (1980): Generation of cytotoxic T lymphocytes to syngeneic tumor by using co-stimulator (interleukin 2). *J. Immunol.*, 125, 1897-1903.
- 40) Farrar, W.L., Johnson, H.M. and Farrar, J.J. (1981): Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2. *J. Immunol.*, 126, 1120-1125.
- 41) Hefeneider, S.H., Conlin, P.J., Henney, C.S. and Gillis, S. (1983): In vivo interleukin 2 administration augments the generation of alloreactive cytotoxic T lymphocytes and resident natural killer cells. *J. Immunol.*, 130, 222-227.
- 42) Henney, C.S., Kuribayashi, K., Kern, D.E. and Gillis, S. (1981): Interleukin 2 augments natural killer cell activity. *Nature*, 291, 335-338.
- 43) Kuribayashi, K., Gillis, S., Kern, D.E. and Henney, C. (1981): Murine NK cell cultures: effects of interleukin 2 and interferon on cell growth and cytotoxic reactivity. *J. Immunol.*, 126, 2321-2327.
- 44) Dempsy, R.A., Dinarello, C.A., Mier, J.W., Rosenwasser, L.J., Allegretta, M., Brown, T.E. and Parkinson, D.R. (1982): The differential effects of human leukocytic pyrogen/lymphocyte-activating factor, T cell growth factor and interferon on human natural killer activity. *J. Immunol.*, 129, 2504-2510.

- 45) Burnet, F.M. (1970): The concept of immunological surveillance. *Progr. exp. Tumor Res.*, 13, 1-27.
- 46) Burnet, F.M. (1964); Immunological factors in the process of carcinogenesis. *Brit. med. Bull.*, 20, 154-158.
- 47) Prehn, R.T. and Lappe, M.A. (1971): Immunostimulation theory of tumor development. *Transplant. Rev.*, 7, 26-54.
- 48) Klein, G. (1966): Tumor antigens. *Annu. Rev. Microbiol.*, 20, 223-252.
- 49) Prehn, R.T. and Main, J.W. (1957): Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *JNCI*, 18, 769-778.
- 50) Kamo, I. and Friedman, H. (1977): Immunosuppression and the role of suppressive factors in cancer. *Advan. Cancer Res.*, 25, 271-321.
- 51) Currie, G.A. and Basham, C. (1972): Serum mediated inhibition of the immunological reactions of the patient to his own tumour. : a possible role for circulating antigen. *Br. J. Cancer*, 26, 427-438.
- 52) 藤本重義 (1979) : 担癌生体における抑制性T細胞, 免疫(代謝), 16, 81-89.
- 53) Fujimoto, S., Greene, M.J. and Schon, A.H. (1976): Regulation of the immune response to tumor antigens. I. Immunosuppressor cells in tumor-bearing hosts. *J. Immunol.*, 116, 791-799.
- 54) Greene, M.I., Pierrea, A., Dorf, M. and Benacerraf, B. (1977): The I-J subregion coded for determinants on suppressor factor(s) which limit the contact sensitivity response to picrylchloride. *J. Exp. Med.*, 146, 293-299.
- 55) 中村興太郎 (1975) : *Cryoimmunology*, 低温医学, 1, 51-60.
- 56) Ablin, R.J. (1976); Immunological aspects of cryosurgery. Consideration of recent experimental and clinical development, their implications and indications for further study. I. Experimental developments. 低温医学, 2, 61-73.
- 57) 富田俊一, 奥田稔, 坂口幸作, 川堀真一 (1980) : 凍結治療の免疫学的考察 I. 動物実験研究, 日本癌治療学会雑誌, 15, 1091-1097.
- 58) 富田俊一, 坂口喜清, 奥田稔 (1982) : 凍結治療の免疫学的考察 II. 動物実験研究: 凍結治療初期の抑制性T細胞産生による抗腫瘍性免疫能の低下, 日本癌治療学会雑誌, 17, 1003-1008.

- 59) 池田公考, 大場直人 (1978): 悪性腫瘍に対する凍結手術 - 特に Immunochemotherapy との併用に関し - , 低温医学, 4, 16-24.
- 60) Neel, H.B. and Ritts, R.E. (1977): Immunotherapeutic effects of tumor necrosis in situ. Tr. Am. Acad. Ophth. Otol., 84, 285-290.
- 61) Moore, F.T., Blackwood, J., Sanzenbacher, L. and Pace, W.G. (1968): Cryotherapy for malignant tumors: immunologic response. Arch. Surg., 96, 527-529.
- 62) Tanaka, S. (1982): Immunological aspects of cryosurgery in general surgery; Biomedical Thermology, Progress in clinical and biological research, 107, 799-814.
- 63) Ablin, R.J. (1976): Immunological aspects of cryosurgery. Consideration of recent experimental and clinical development, their implications and indications for further study. II. Clinical developments. 低温医学, 2, 121-129.
- 64) Mazur, P. (1966): Physical-chemical factors underlying cell injury in cryosurgical freezing: Cryosurgery (Rand, R.W., et al., editor), Charles C. Thomas Co., 32-51.
- 65) 田中茂男 (1976): 癌の凍結手術, 外科治療, 35, 587-597
- 66) 湊長博 (1981): インターフェロンとナチュラルキラー作用; インターフェロン研究の進歩 (川出由己, 桑田次男, 小林茂保), 1版, 共立出版, 東京, 272-284, 昭和56
- 67) Bloom, B., Minato, N., Neighbour, A., Reid, L. and Marcus, D. (1981): Interferon and NK cells in resistance to persistently virus-infected cells and tumors; Natural cell-mediated immunity against tumors (Herberman, R.B., editor), ed. 1, Academic press, New York, 505-524.
- 68) Gidlund, M., Örn, A., Wigzell, H., Senik, A. and Gresser, I. (1978): Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. Nature, 273, 759-761.
- 69) Potter, M.R., Moore, M. and Morris, A.G. (1982): Stimulation of natural cytotoxic activity in mixed cell cultures and by culture supernatants containing interferon. Immunology, 46, 401-409.
- 70) Djeu, J.Y., Huang, K. and Herberman, R.B. (1980): Augmentation of mouse natural killer activity and induction of interferon by tumor cells in vivo. J. Exp. Med., 151, 781-789.



- 71) 熊谷勝男(1983): NK細胞の増強; 新免疫学叢書 10 キラー細胞 (畔柳武雄, 大高裕一, 松橋直編), 1版. 医学書院, 152-171, 昭和58.
- 72) Trinchieri, G. and Santoli, D. (1978): Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis. J. Exp. Med. 147, 1314-1333.
- 73) Trinchieri, G., Santoli, D., Dee, R.R. and Knowles, B.B. (1978): Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation. J. Exp. Med., 147, 1299-1313.
- 74) Minato, N., Reid, L., Cantor, H., Lengyel, P. and Bloom, B.R. (1980): Mode of regulation of natural killer cell activity by interferon. J. Exp. Med., 152, 124-137.
- 75) Grimm, W., Seitz, M., Kirchner, H. and Gemsa, D. (1978): Prostaglandin synthesis in spleen cell cultures of mice injected with *Corynebacterium parvum*. Cell. Immunol., 40, 419-426.
- 76) Humes, J.L., Cupo, J.J. and Strausser, H.R. (1974): Effects of indomethacin on moloney sarcoma virus-induced tumors. Prostaglandins, 6, 463-473.
- 77) Pelus, L.M. and Strausser, H.R. (1977): Mini review, Prostaglandin and the immune response, Life science, 20, 903-914.
- 78) 加藤幸太郎(1984): 免疫とアラキドン酸カスケード; 現代化学 増刊1 プロスタグランジンと病態. (室田誠速編), 1版, 東京化学同人, 東京, 166-175, 昭和59.
- 79) Lynch, N.R., Castes, M., Astoin, M. and Salomon, J., -C. (1978): Mechanism of inhibition of tumour growth by aspirin and indomethacin. Br. J. Cancer, 38, 503-512.
- 80) 松田好史, 木本宏昭, 北目文郎, 石田名香雄(1977): 担癌マウス血清中に見いだされた免疫抑制活性を示す酸性蛋白, 医学のあゆみ, 102, 747-749
- 81) Yamauchi, K., Fujimoto, S. and Tada, T. (1979): Differential activation of cytotoxic and suppressor T cells against syngeneic tumors in the mouse. J. Immunol., 123, 1653-1658.
- 82) Bertschmann, M. and Lüscher, E.F. (1983): Stimulation of different pathways of T-cell functions by syngeneic tumor cells and soluble membrane proteins. Cell. Immunol., 78, 13-22.

- 83) 馬島敏郎, 品川保弘, 左味俊介, 中村武彦, 石田名香雄 (1983): 癌性腹水中の低分子免疫抑制物質, 日本癌学会総会記事 第42回総会, p 118.
- 84) Aune, T.M. and Pierce, C.W. (1981): Identification and initial characterization of a nonspecific suppressor factor (M $\phi$ -SF) produced by soluble immune response suppressor (SIRS)-treated macrophages. *J. Immunol.*, 127, 1828-1833.
- 85) Kaszubowski, P.A. and Goodwin, J.S. (1982): Monocyte-produced prostaglandin induces Fc $\gamma$  receptor expression on human T cells. *Cell. Immunol.*, 68, 343-348.
- 86) Rogers, T.J., Nowowiejski, I. and Webb, D.R. (1980): Partial characterization of a prostaglandin-induced suppressor factor. *Cell. Immunol.*, 50, 82-93.
- 87) Stenson, W.F. and Parker, C.W. (1980): Opinion Prostaglandins, macrophages, and immunity. *J. Immunol.*, 125, 1-5.
- 88) Favalli, C., Leport, P., Jaffe, B.M., Santoro, M.G., Simmet, T., Gobbo, V.D. and Garaci, E. (1982): The differential effects of PGE on the immune response in normal and immunosuppressed mice. *Cell. Immunol.*, 72, 351-359.
- 89) Susskind, B.M., Merluzzi, V.J., Faanes, R.B., Palladino, M.A. and Choi, Y.S. (1983): Regulatory mechanisms in the cytotoxic T lymphocyte development. I. A suppressor T cell subsets that regulates the proliferative stage of CTL development. *J. Immunol.*, 130, 527-532.
- 90) Haller, O. (1980): In vivo activity of murine NK cells; Natural cell mediated immunity against tumors (Herberman, R.B., editor). ed. 1, Academic press, New York, 1105-1116.
- 91) Herberman, R.B. and Ortaldo, J.R. (1981): Natural killer cells: their role in defenses against disease. *Science*, 214, 24-30.
- 92) 内田温士, 星野孝 (1983): NK細胞と免疫療法 - OK-432によるNK活性増強と臨床効果 -, 日本臨床免疫学会会誌, 6, 403-406

Immunological response in cryoimmunotherapy  
of malignant tumors

— The mechanism of the rise and fall of NK activity and cytotoxic  
T lymphocytes after inoculation of cryo-destroyed Meth A cells—

MITSUHIRO NAKAZAWA

The Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery

Osaka University Faculty of Dentistry

1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Key words: cryosurgery, NK activity, CTL, cytokines, cancer

In this study, mechanism on the rise and fall of natural killer (NK) cell activity and cytotoxic T lymphocytes (CTL) was investigated after inoculation of cryo-destroyed Meth A.

Cryo-destroyed Meth A (Cryo-Meth A) enhanced NK activity, while Meth A treated with Mitomycin C (MMC-Meth A) induced low NK activity. On the contrary, MMC-Meth A induced CTL although Cryo-Meth A could not induce CTL.

Splenocytes from syngeneic BALB/c mice inoculated with Cryo-Meth A highly produced interferon (IFN) and prostaglandin E (PGE). On the other hand, splenocytes from mice inoculated with MMC-Meth A produced PGE, but did not or slightly produced IFN. Still more, NK activity was highly detected in the mice injected with IFN( $\alpha$ & $\beta$ ) and NK activity in the mice inoculated with MMC- or Cryo-Meth A was restored or enhanced by administration of

indomethacin.

The above results suggest that the factors influencing NK activity are IFN and PGE, that is, the former enhancing NK activity and the latter suppressive.

The failure of CTL induction by Cryo-Meth A inoculation was due to followings.

Cryo-Meth A stimulated suppressor T cell induction and depressed the pathway of CTL induction through interleukin 2(IL-2). Furthermore helper function of adherent splenocytes including macrophages for CTL induction was somewhat decreased in mice inoculated with Cryo-Meth A.

Thus cryosurgery augmented the non-specific immunity such as NK activity but could not induce tumor-specific immunity.

These results suggested that cryosurgery was not so useful as a tumor-specific immunotherapy. However it was considered that cryosurgery could be utilized as a tumor immunotherapy in combination with immuno-modulating agents which suppressed the induction of suppressor T cells and the production of PGE.

## 図・表の説明

## 図1 : NK細胞活性の測定法

$^{51}\text{Cr}$ 放出試験を用いた。CTL活性の測定もほぼ同様に行なったが、標的細胞に Meth A を用いたことと、エフェクター細胞をコンレイ、フィコール法で分離後、抗アシアロGM1抗体を用いてNK細胞を除去したことで、およそ混合培養の時間を12時間にしたことが異なる。

## 図2 : インターフェロンの定量方法

## 図3 : インターロイキン2活性の測定方法

## 図4 : インターロイキン2標準曲線

作製したIL-2標準品の2倍段階希釈列 ( $1/1 \sim 1/32$ ) をつくり、図3のようにして  $^3\text{H-TdR}$  のとりこみと測定し、得られたcpmを縦軸に、希釈倍数(カ価)を横軸にと

、7標準曲線を作製した。この図を用いて、同時に測定したサンプルのcpmより力価を求めた。

5 図5 : In vitro での二次刺激による CTL の誘導

図6 : MMC-Meth A , Cryo-Meth A 接種による NK 活性の変動

10 MMC-Meth A または Cryo-Meth A の 100 万個相当量をマウス腹腔内に接種し、3、7および14日目の NK 活性を調べた。

数値は % of specific release で示した。

(平均値 ± S.D., 各群 n = 3)

Control に対する有意差 \*... p < 0.05

15 図7 : MMC-Meth A , Cryo-Meth A 接種による CTL 活性の変動

図6と同様にして CTL 活性を調べた。

数値は % of specific release で示した。

(平均値 ± S.D., 各群 n = 3)

有意差 \* - 7日目と14日目  $p < 0.05$   
 \*\* - 21日目  $p < 0.01$

図8 : MMC-Meth A 接種マウスの NK 活性におよ  
 ぼす Cryo-Meth A の影響

MMC-Meth A 接種後3日目に Cryo-Meth A を接  
 種し、7、14および21日目に NK 活性を  
 測定した。数値は S.I. で示した。

\* ...  $p < 0.05$

図9 : MMC-Meth A 接種マウスの CTL 活性におよ  
 ぼす Cryo-Meth A の影響

図8と同様にして、CTL 活性を測定し  
 た。数値は % of specific release で示した。  
 (平均値  $\pm$  S.D.)。有意差なし。

図10 : MMC-Meth A , Cryo-Meth A 接種後の脾細胞の  
 インターフェロン産生能および血中イ  
 ンターフェロン濃度

\* ...  $P < 0.01$

図 11 : NK 活性におよぼす IFN 投与の効果

IFN ( $\alpha$ & $\beta$ ) の 100 U ニット をマウス腹腔  
内に投与し、3 日後の NK 活性を測定し  
た。数値は % of specific release で示した。  
( 平均値  $\pm$  S.D. , 各群  $n = 4$  )。S.I. は  
3.5 であった。 \* ...  $P < 0.001$

図 12 : In vitro での刺激による IFN 産生

正常マウスの脾細胞を in vitro で MMC-  
Meth A または Cryo-Meth A と混合培養し、培  
養上清中のインターフェロン活性を測定  
した。( 平均値  $\pm$  S.D. , 各群  $n = 3$  )

図 13 : pH 2 処理後のインターフェロン活性

Cryo-Meth A 接種後 10 日目のマウスの脾細  
胞の培養上清を pH 2 の HCl-KCl buffer で  
処理し、処理前後の IFN 活性を測定した。  
( 平均値  $\pm$  S.D. )。有意差は認められな  
い。



図 14 : MMC-Meth A , Cryo-Meth A 接種後の脾細胞の  
 プロスタグランジン E 産生能と血中  
 プロスタグランジン E 濃度

5 図 15 : インドメタシン投与による PGE 産生能  
 と血中濃度の変化

MMC-Meth A または Cryo-Meth A 接種後 3 日  
 にインドメタシン  $1 \times 10^{-6} M / 匹$  を投与し  
 PGE の変動を調べた。

10 図 16 : インドメタシン投与による NK 活性の  
 変化

図 15 と同じ処置をしたマウスの NK 活  
 性を調べた。数値は S.I. であらわした。

15 図 17 : PGE ( E<sub>1</sub> および E<sub>2</sub> ) による IFN 産生阻  
 害

( 平均値 ± S.D. , 各群 n = 3 )

Control ( PGE を加えないもの ) に対す  
 る有意差 \*...  $p < 0.05$       \*\*...  $p < 0.01$

図18 : PGE (E<sub>1</sub> および E<sub>2</sub>) と IFN 同時投与の  
NK 活性に及ぼす影響

数値は % of specific release で示した。

(平均値 ± S.D. , 各群 n = 3)

有意差 ( IFN 単独投与群 と PGE + IFN  
同時投与群 の比較 ) \* p < 0.01

図19 : In vitro での二次刺激による CTL の誘導  
図5の方法で、MMC-Meth A 接種後3日目  
のマウスの脾リンパ球を二次刺激し、  
CTL の誘導を調べた。

数値は % of specific release であらわした。

(平均値 ± S.D. , 各群 n = 3)

control に対する有意差 \* p < 0.05

\*\* p < 0.01

図20 : サブレッサー T細胞の検索

(1) Cryo-Meth A 接種後3日目の脾リンパ球を  
使用

(2) Cryo-Meth A 接種後10日目の脾リンパ球を

使用

図21: シクロフォスファミド併用実験スケジュール

図22: Cryo-Meth A とシクロフォスファミド併用による延命効果

図21のスケジュールに従って実験し、生存日数を調べた。(平均値 ± S.D., n=5)  
 ・ Control に対する有意差 \*...  $p < 0.001$

図23: MMC-Meth A, Cryo-Meth A 接種による脾細胞の IL-2 産生能および血中 IL-2 活性

図24: CTL 活性に対する IL-2 投与の効果

MMC-Meth A または Cryo-Meth A をマウスに接種し、10日目に IL-2 100 ユニットを投与して、14日目の CTL 活性を測定した。

数値は % of specific release で示した。

(平均値 ± S.D., 各群 n = 3)

Control に対する有意差

\* ...  $p < 0.001$

\*\* ...  $p < 0.01$

また、(MMC-Meth A + IL-2) 群では、IL-2  
を投与しない場合 ( $7.8 \pm 0.87\%$ ) に比べ、  
有意 ( $p < 0.05$ ) に高い CTL 誘導が認められ  
た。

図 25: NK 活性に対する IL-2 投与の効果

図 24 と同様にして、NK 活性を測定し  
た。数値は % of specific release で示した。  
(平均値  $\pm$  S.D., 各群  $n = 3$ )

Control に対する有意差 \* ...  $p < 0.05$

(Cryo-Meth A + IL-2) 群の NK 活性の S.I.  
は 1.7 で、Cryo-Meth A 単独の場合の 3.2 に  
比べ、低下が認められた。

図 26: CTL 誘導におよぼす IL-2 の効果 (in vitro)

数値は % of specific release で示した。

(平均値  $\pm$  S.D., 各群  $n = 3$ )

・有意差: IL-2(+) と IL-2(-) の比較

\*... MMC 群 -  $p < 0.01$

\*\*... Cryo 群 -  $p < 0.02$

図 27: In vitro での二次刺激による CTL の誘導  
— 付着細胞 (Mφ) 添加の効果

MMC-Meth A 接種後 3 日目のマウスの脾細胞を用いて、図 5 の方法で CTL の誘導を調べた。数値は、% of specific release で示した。(平均値 ± S.D., 各群  $n = 3$ )

Cryo 群では Mφ を加えることにより CTL 誘導が有意 ( $p < 0.05$  - \*) に増強された。

図 28: Mφ の CTL 誘導能

(1) Cryo-Meth A 接種後 14 日目のマウスの脾臓 Mφ と正常マウスの脾臓 Mφ の CTL 誘導能を比較した。リンパ球は Cryo-Meth A 接種後 14 日目のマウスの脾臓より採取したものをを用いた。数値は、% of specific release で示した。(平均値 ± S.D., 各群  $n = 3$ )

Control に対する有意差 \*  $p < 0.02$  \*\*  $p < 0.01$

(2) 正常マウスの脾臓より採取したリンパ球を用いた実験

・有意差 \*...  $p < 0.05$

5 図 29 - (1) : MMC-Meth A 接種後の免疫応答

太い実線は刺激(活性化), 細い実線は抑制, また破線は、抑制を受けたために作動しなかった経路(×印)または未確認の経路を示す。

10 図 29 - (2) : Cryo-Meth A 接種後の免疫応答

実線・破線は図 29 - (1) と同様。

15 表 1 : IL-2 消費試験

リンパ球は、MMC- または Cryo-Meth A 接種後 14 日目のマウスより採取したものを用了。(平均値 ± SD)

表 2 : インドメタシンの CTL 誘導におよぼす影響

図 16 と同様の方法で行なった。

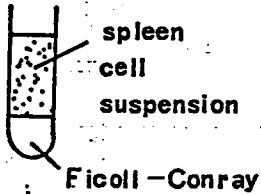
Cryo-Meth A 接種群では、インドメタシン  
を投与しない場合 ( $0.7 \pm 0.35\%$ ) に比べ、有  
意 ( $p < 0.02$ ) の CTL 誘導が認められた。

5

10

15

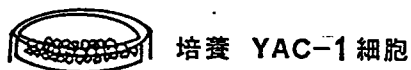
エフェクター細胞  
の作成



遠心分離

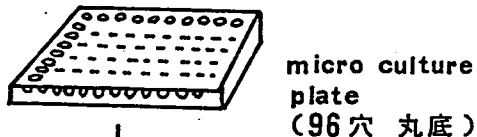
$1 \times 10^5 / 0.1 \text{ ml / well}$

標的細胞の  
作成



$1 \times 10^6$   
 $^{51}\text{Cr}$  標識 1½ ~ 2 時間

$2 \times 10^4 / 0.1 \text{ ml / well}$

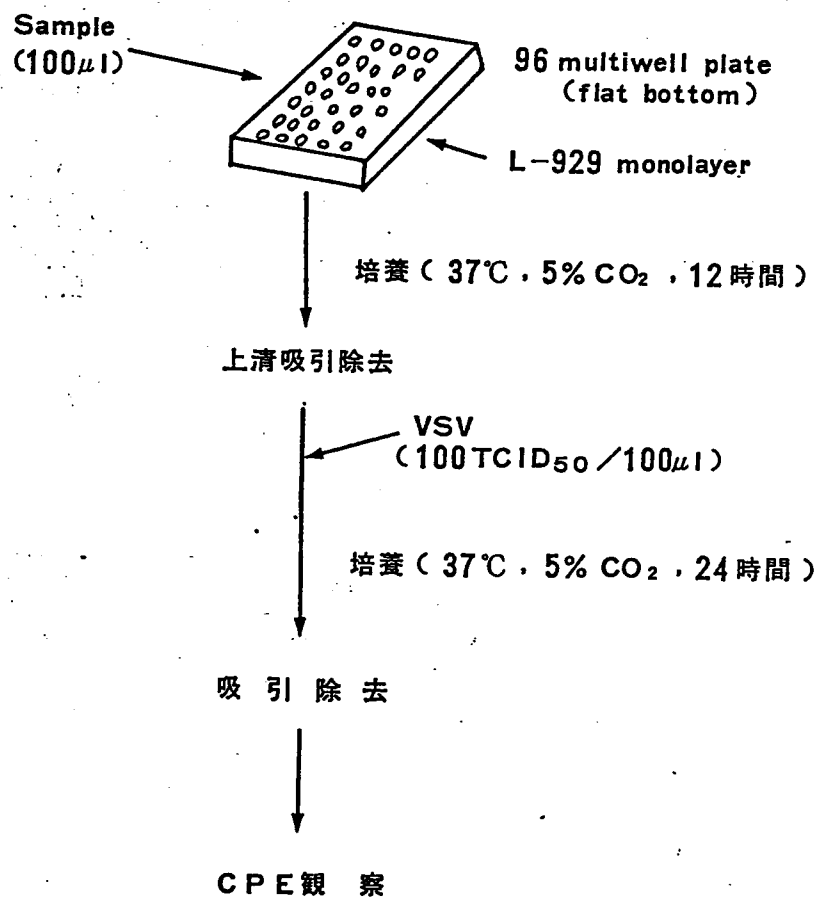


37°C 4 時間培養

上清採取 (0.1 ml)

放射活性を測定





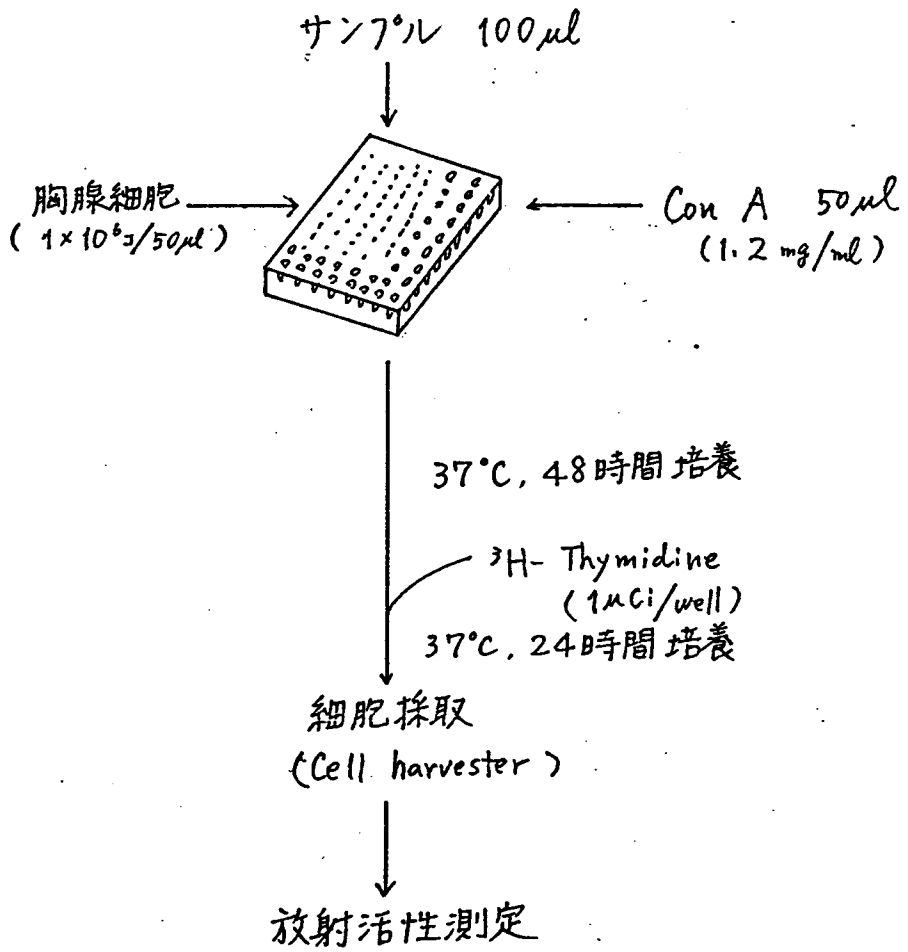
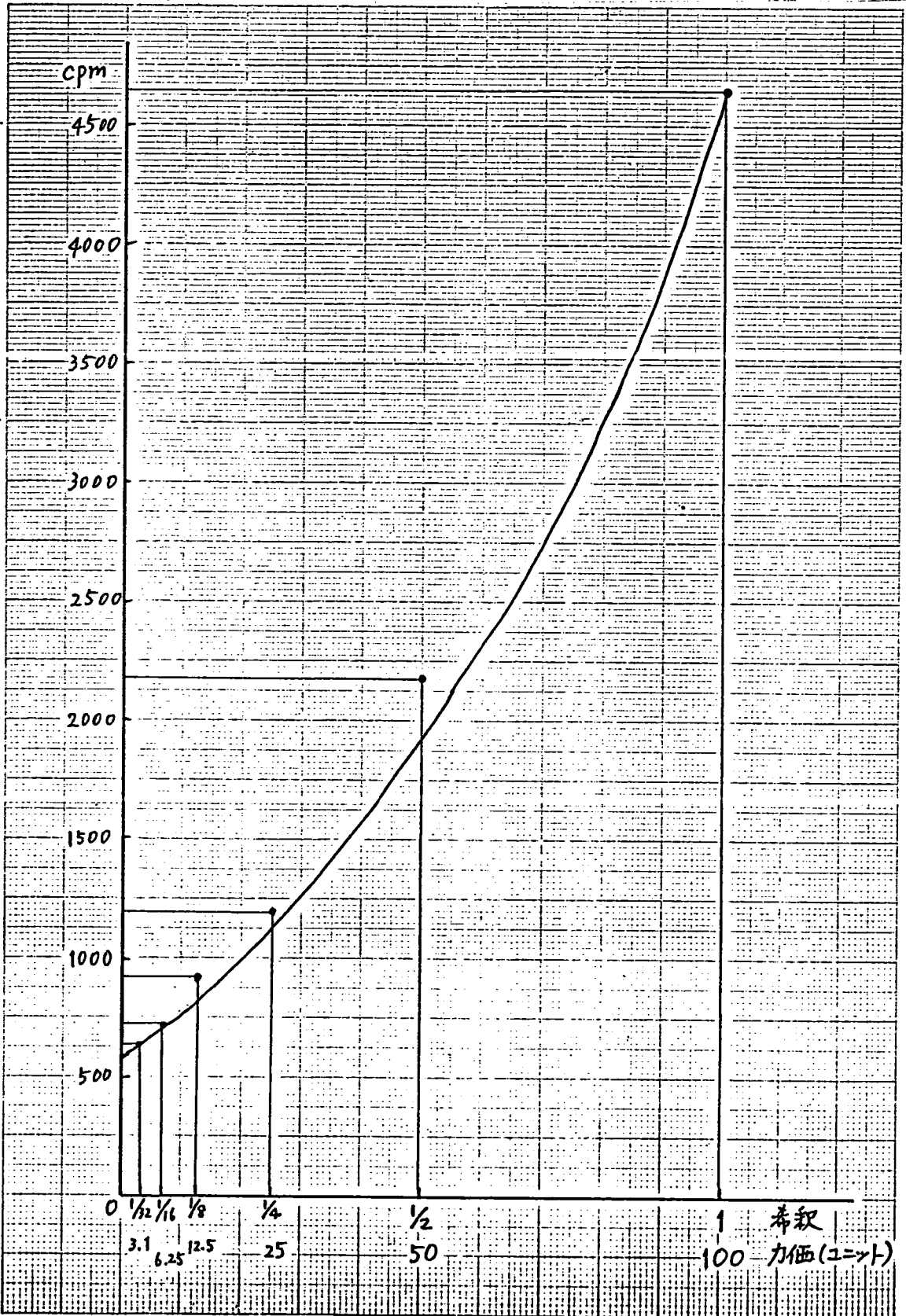
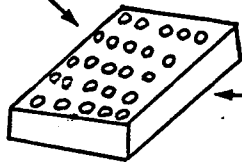


図 4



MMC-Meth A  
又は  
Cryo-Meth A  
( $1 \times 10^4 / 0.1 \text{ ml}$ )



96 multiwell plate

Spleen cell  
又は  
Spleen lymphocyte  
( $5 \times 10^5 / 0.1 \text{ ml}$ )

培養 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5日間)



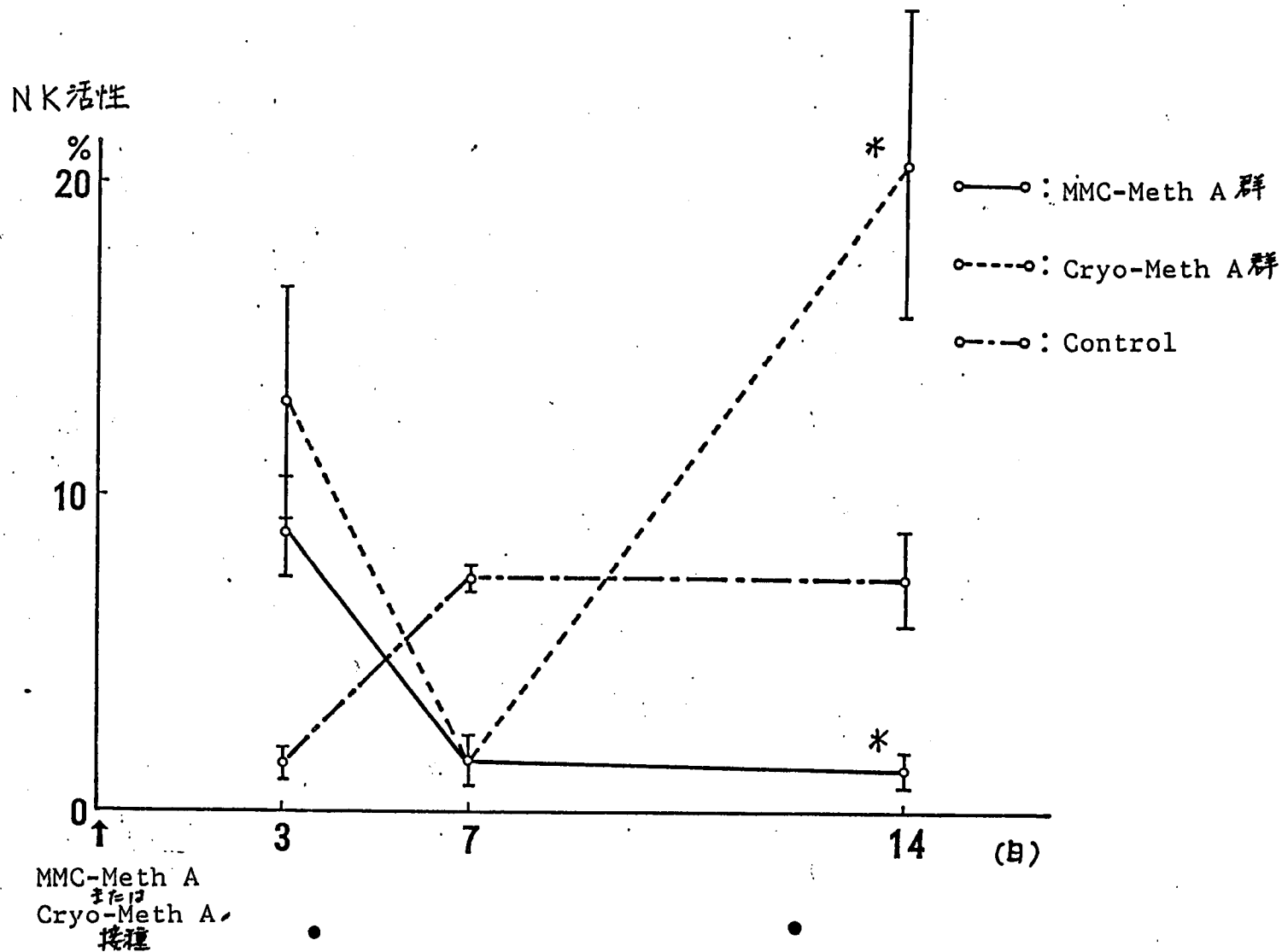
上清吸引除去

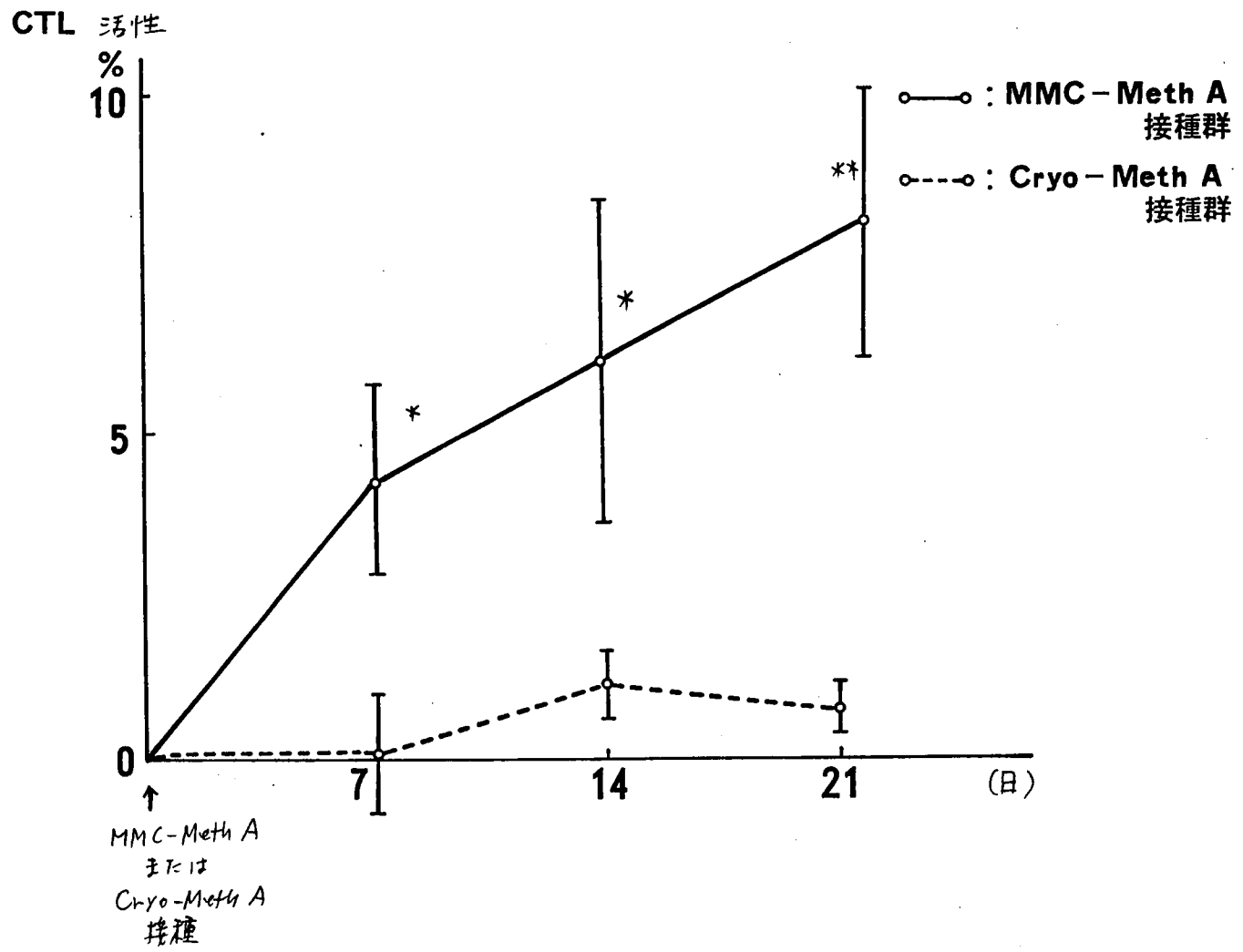
<sup>51</sup>Cr - labeled Meth A  
( $1 \times 10^4 / 0.1 \text{ ml}$ )

培養 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 12時間)

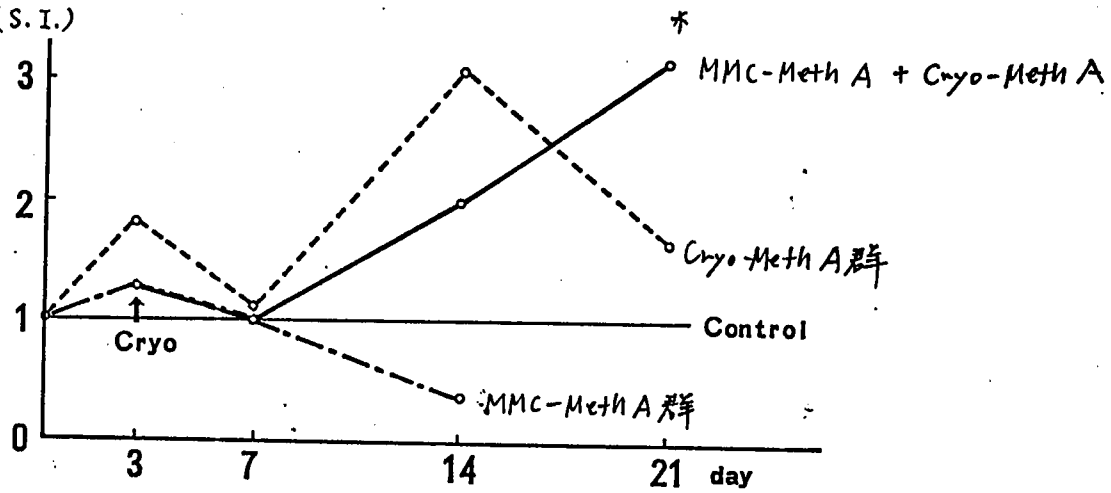
上清中の放射活性測定

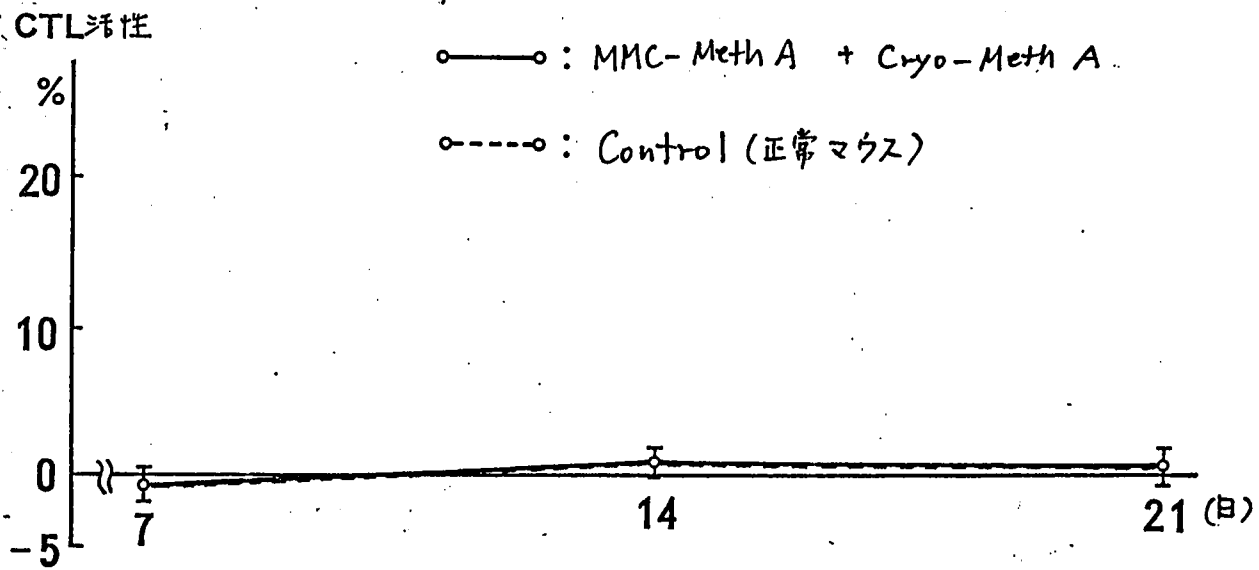
図 6





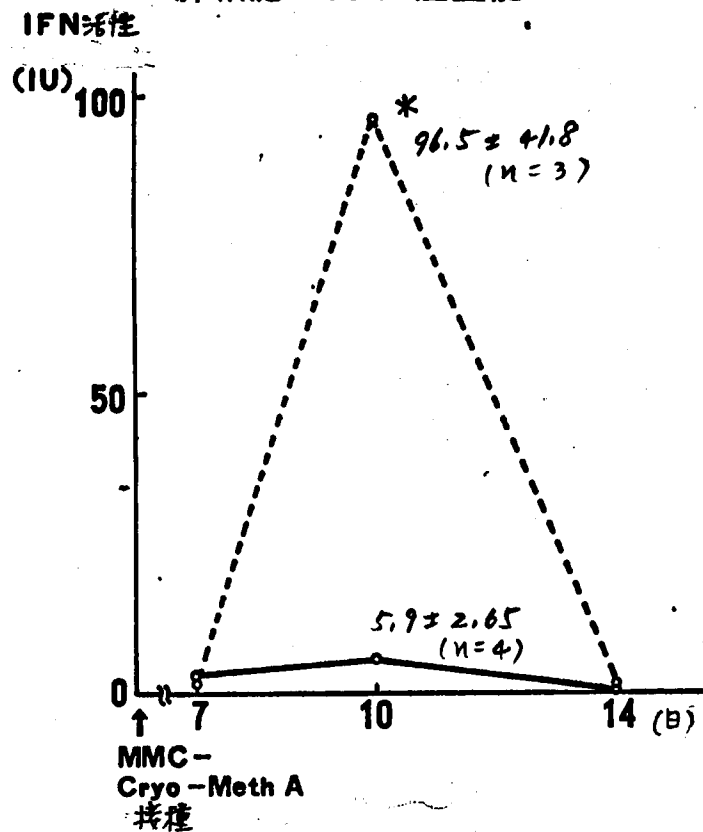
NK活性  
(S.I.)



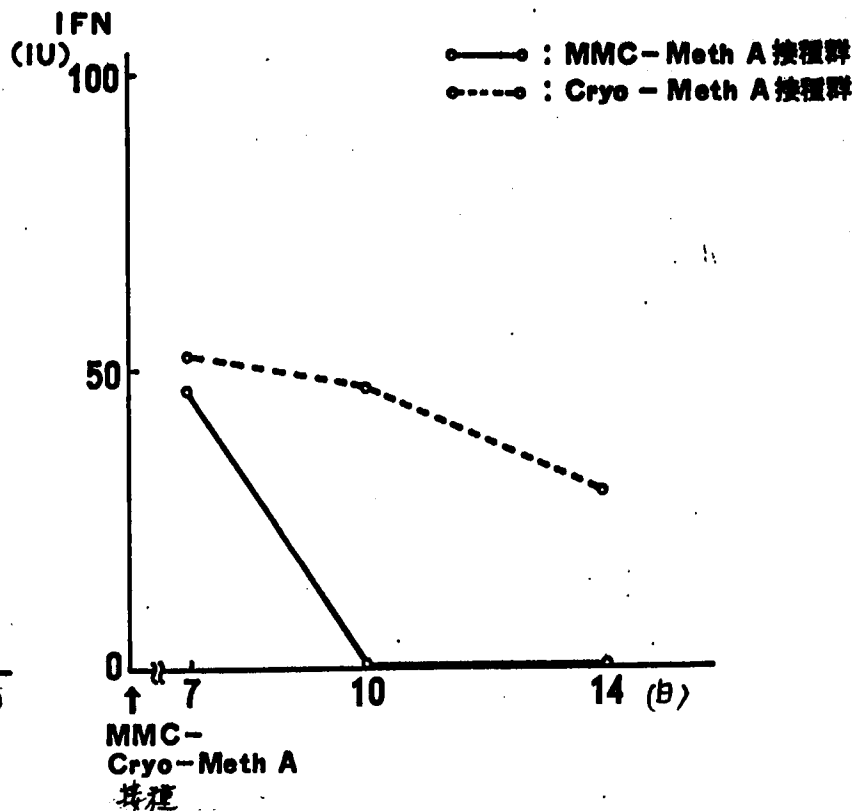




脾細胞のIFN産生能



血清中のIFN濃度



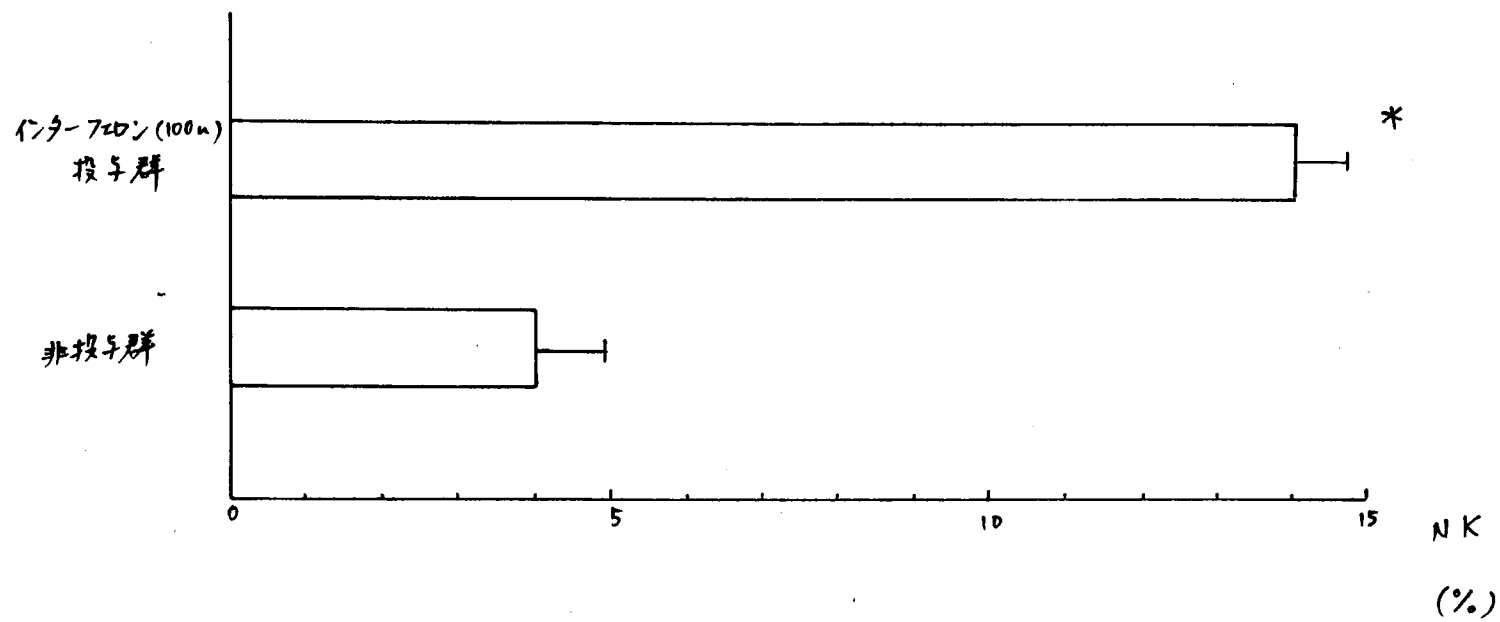
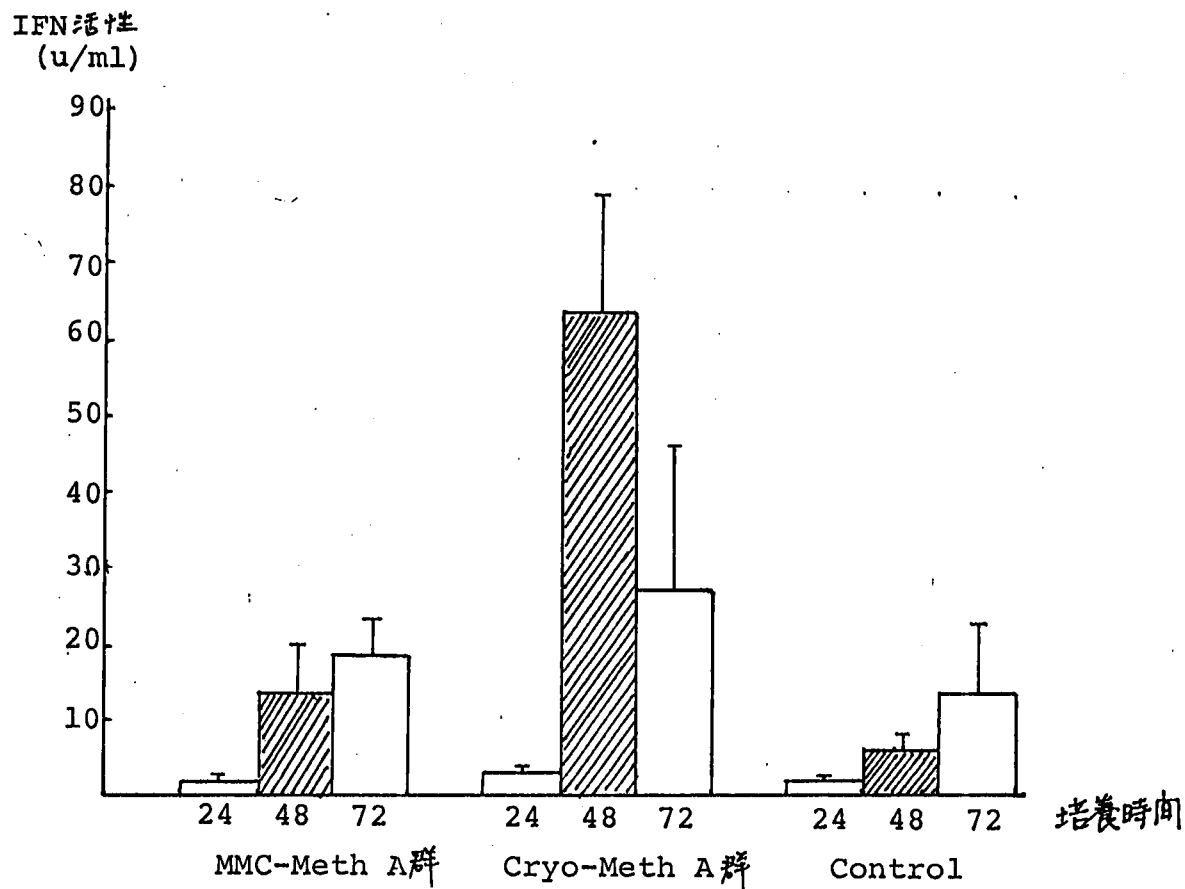


圖 12



PH 2 処理

(-)

(+)

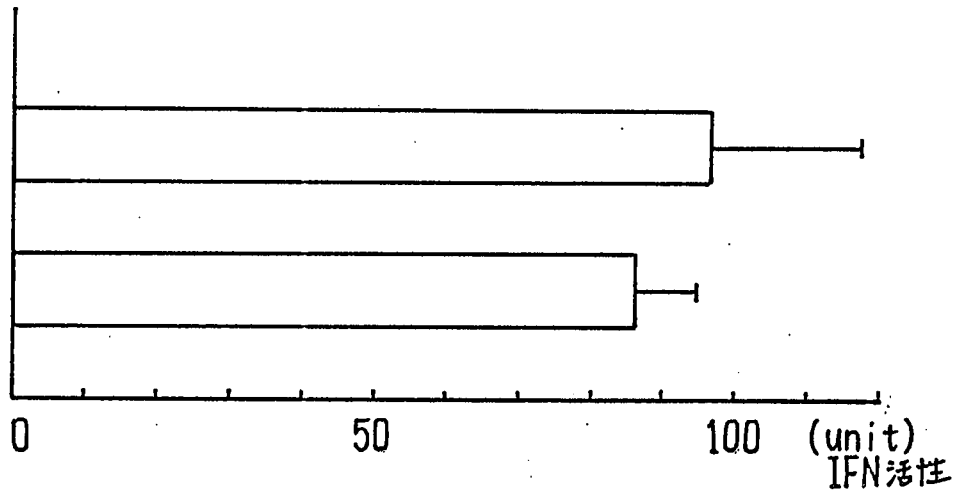
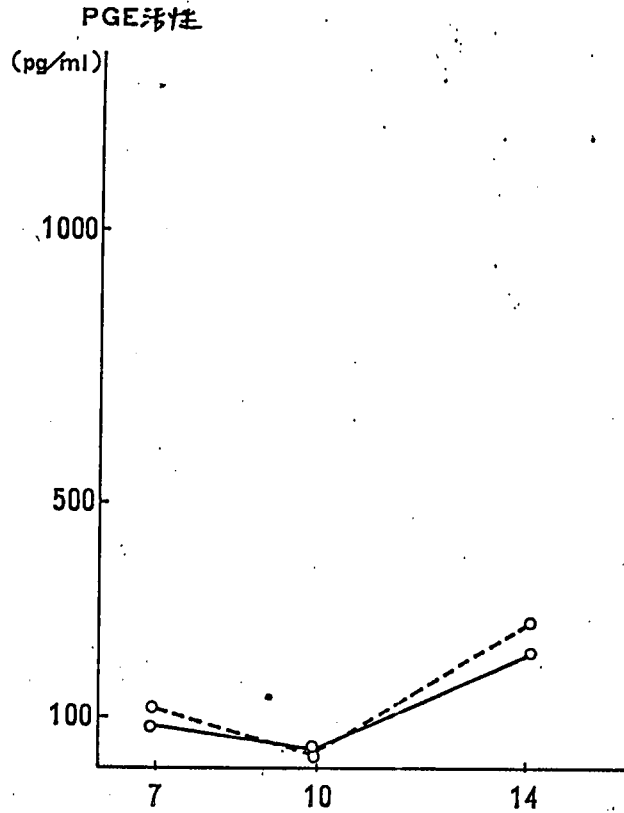


図 14

脾細胞のPGE 産生能



血清中のPGE 濃度

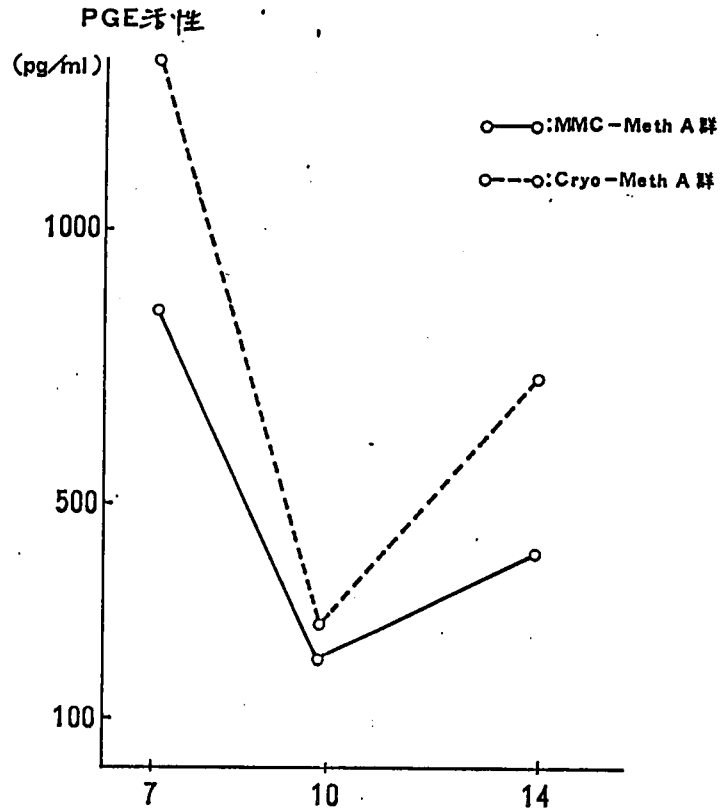
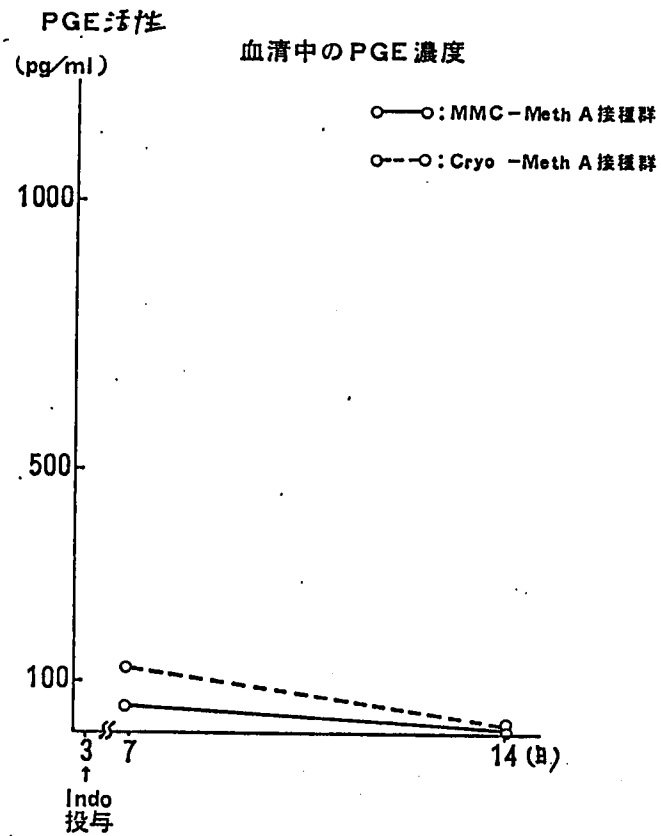
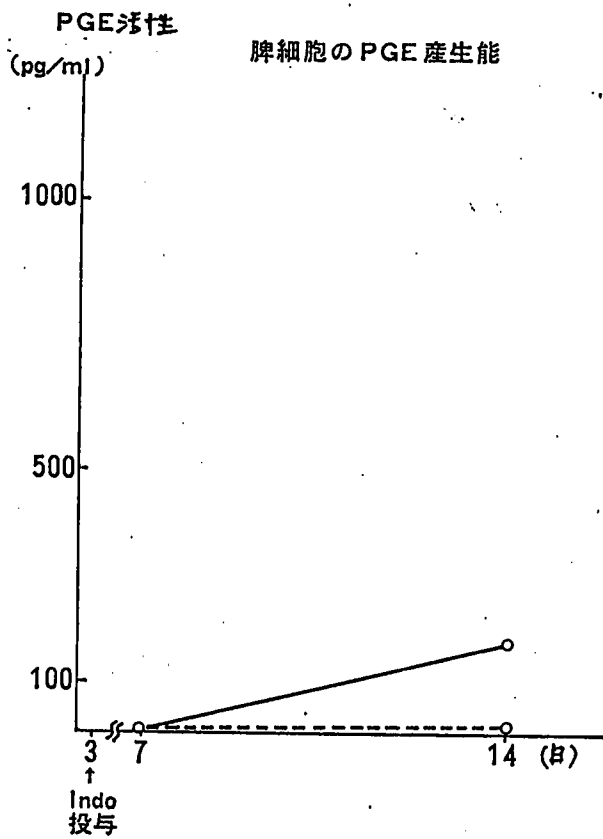
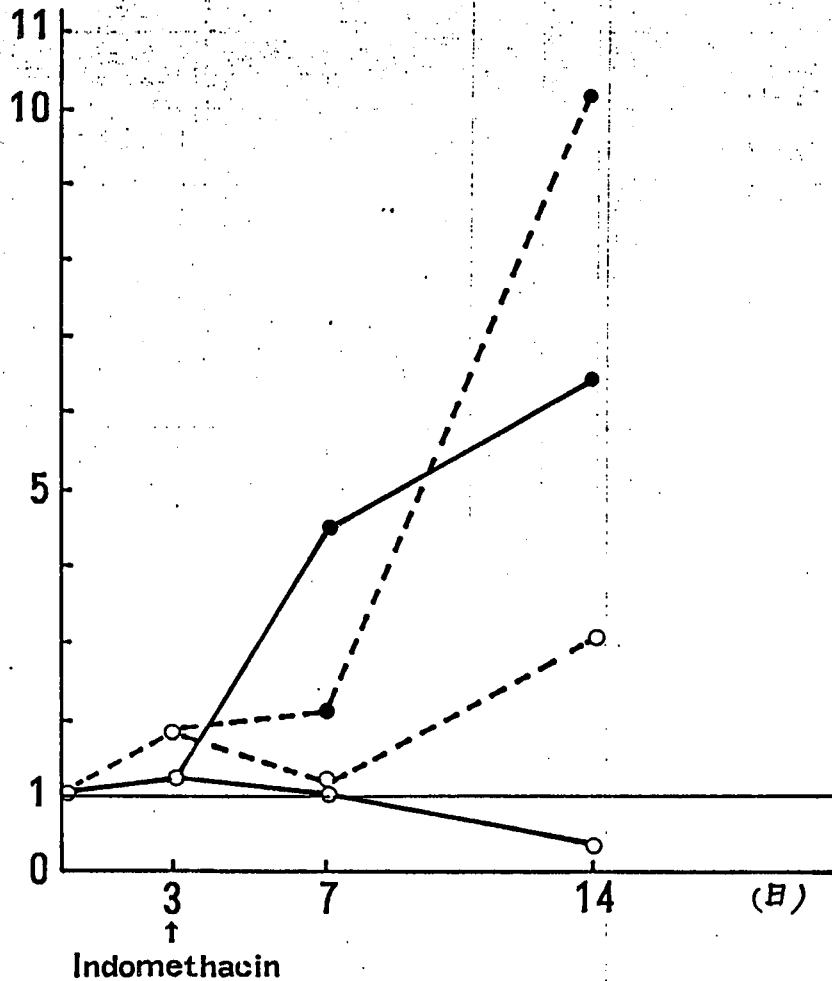


図 15



NK 活性  
(S.I.)



- : MMC-Meth A群, Indo(-)
- : MMC-Meth A群, Indo(+)
- -○ : Cryo-Meth A群, Indo(-)
- -● : Cryo-Meth A群, Indo(+)

図 17

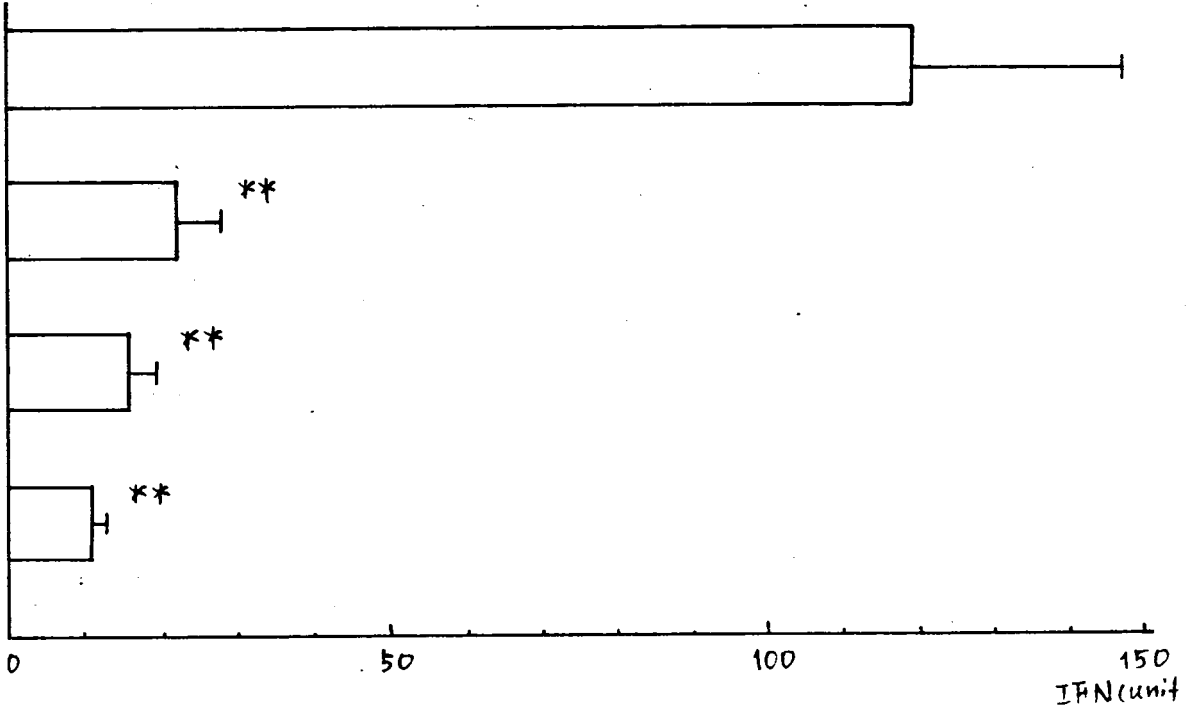
PGE<sub>1</sub>濃度  
(pg/ml)

0

1000

5000

10000



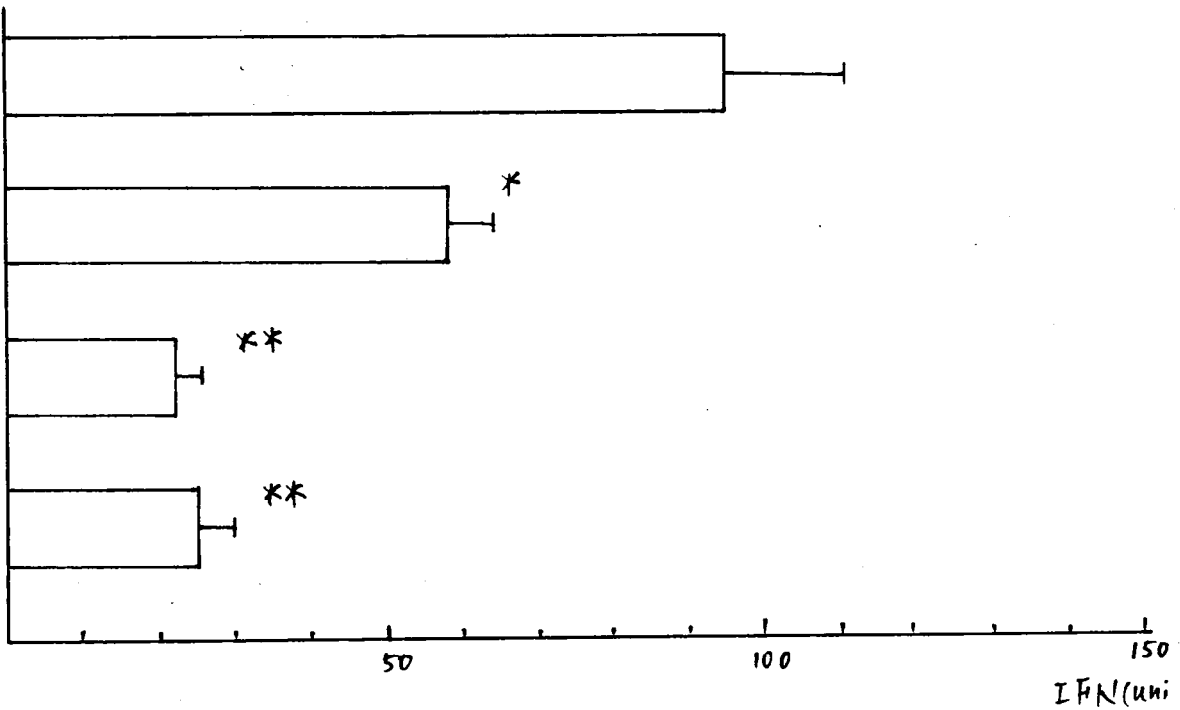
PGE<sub>2</sub>濃度  
(pg/ml)

0

1000

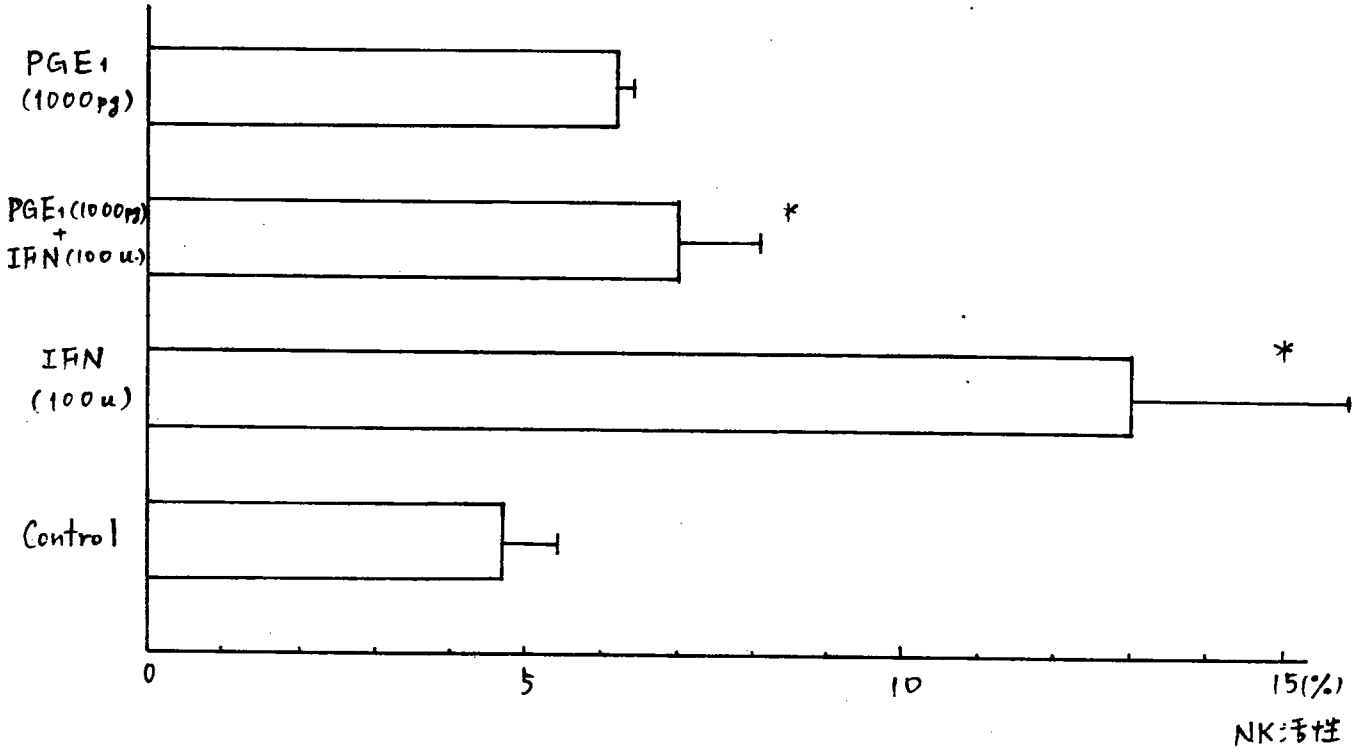
5000

10000

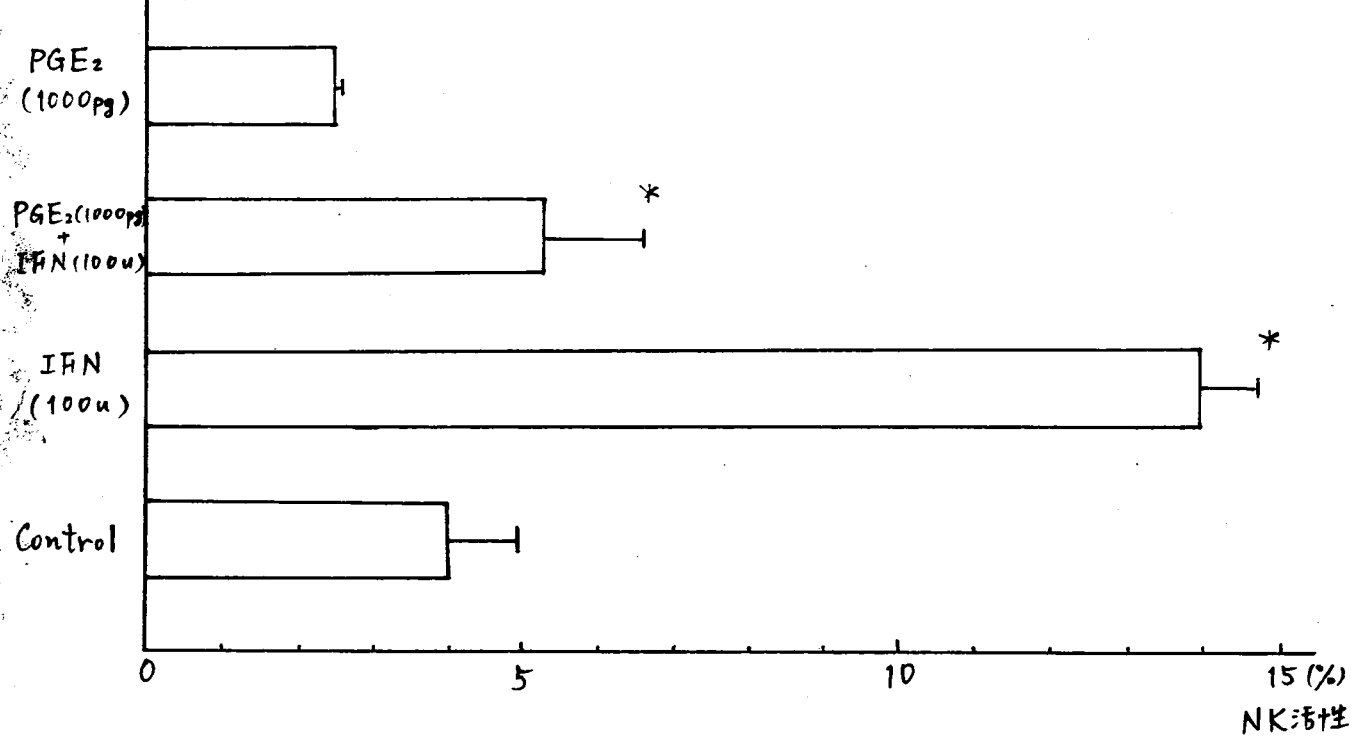




(1) PGE<sub>1</sub>



(2) PGE<sub>2</sub>

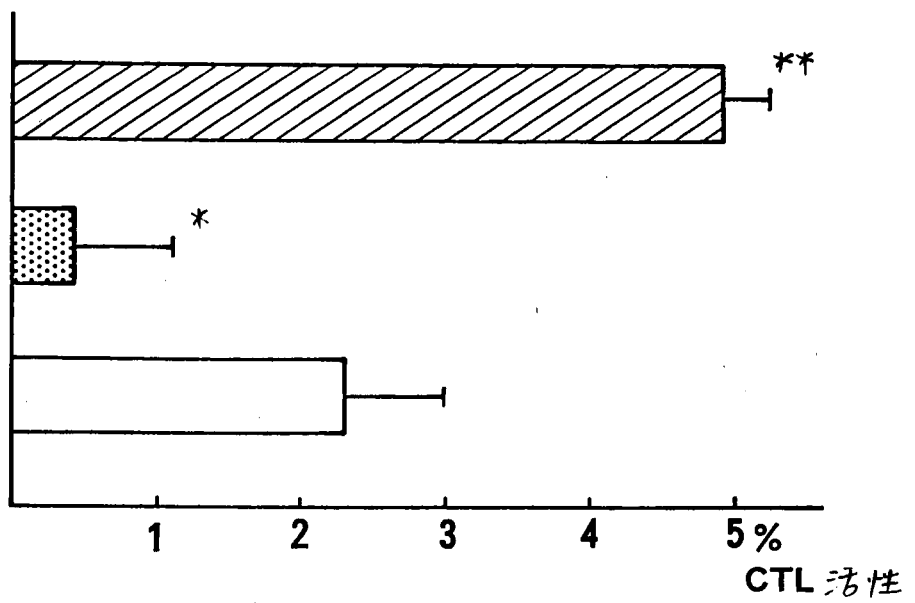


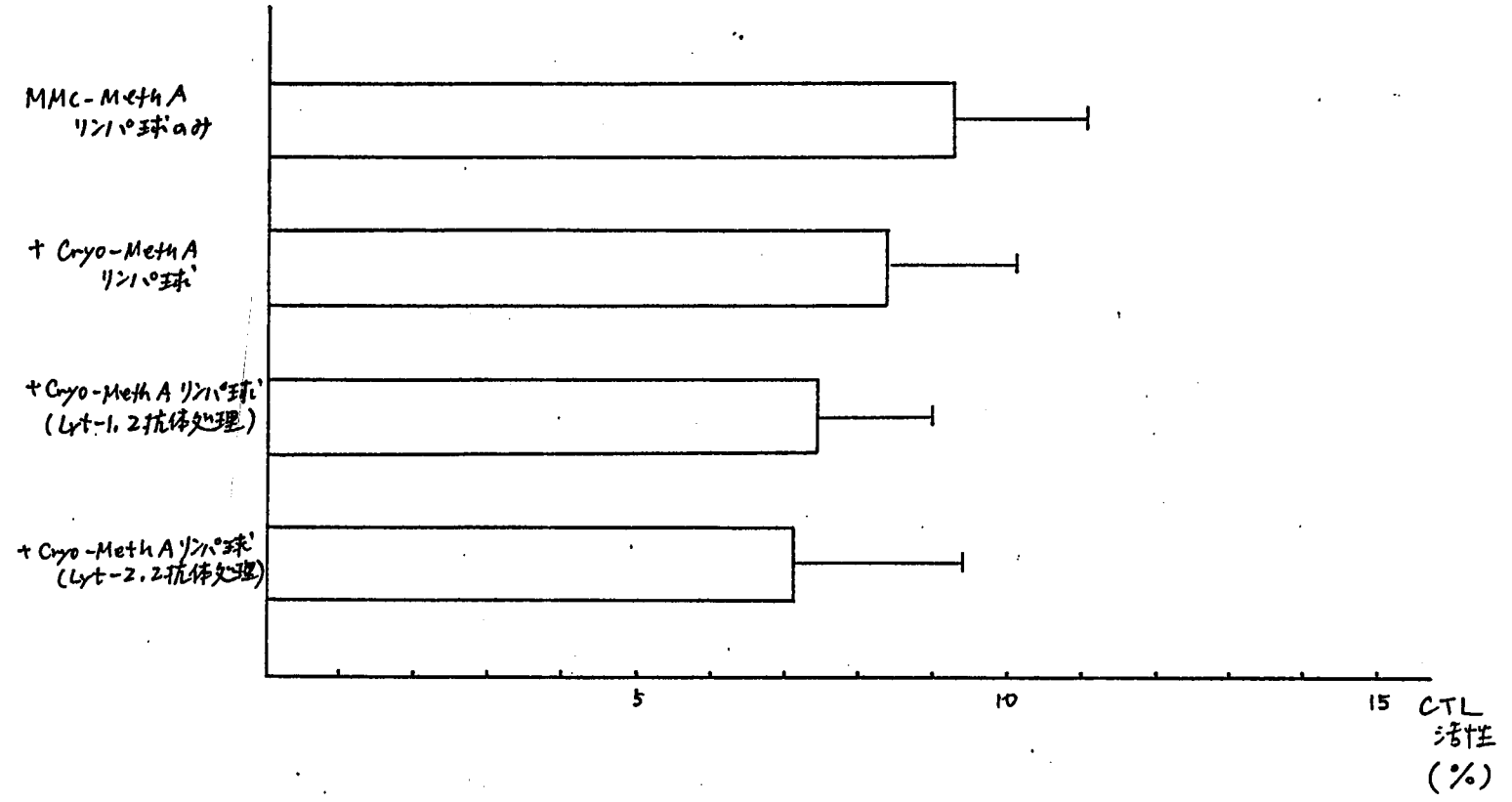
<二次刺激>

MMC-Meth A

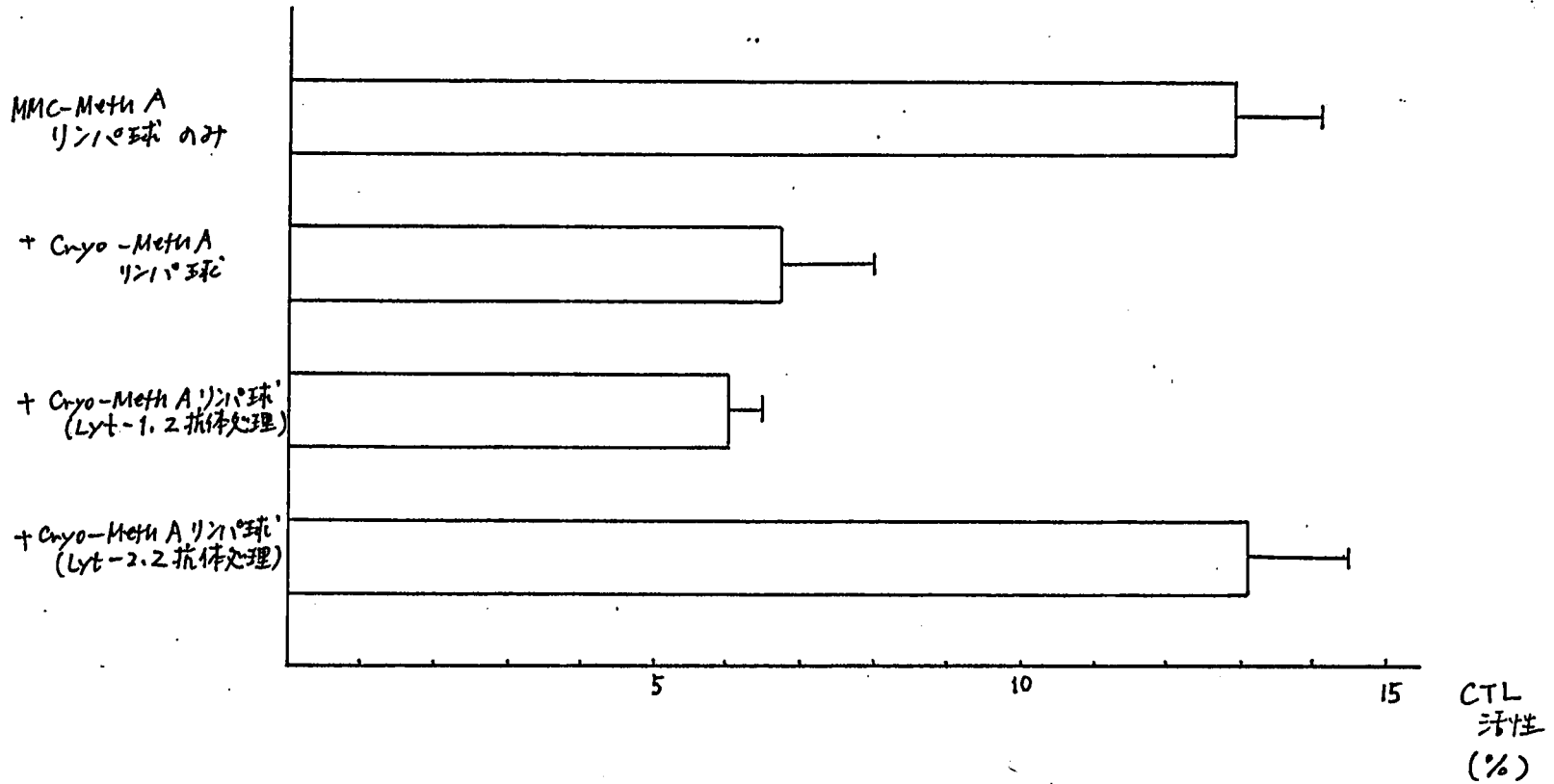
Cryo-Meth A

rL

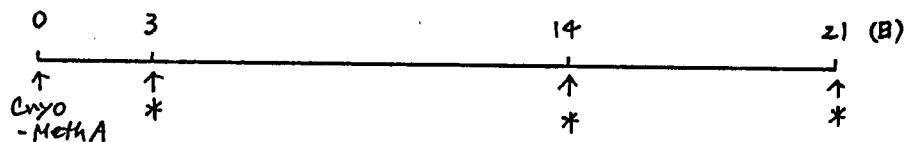




☒ 20-(2)

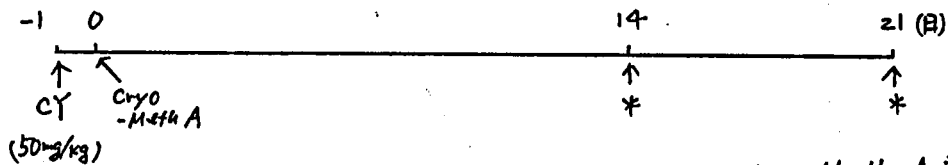


Cryo-Meth A 单独接種の效果



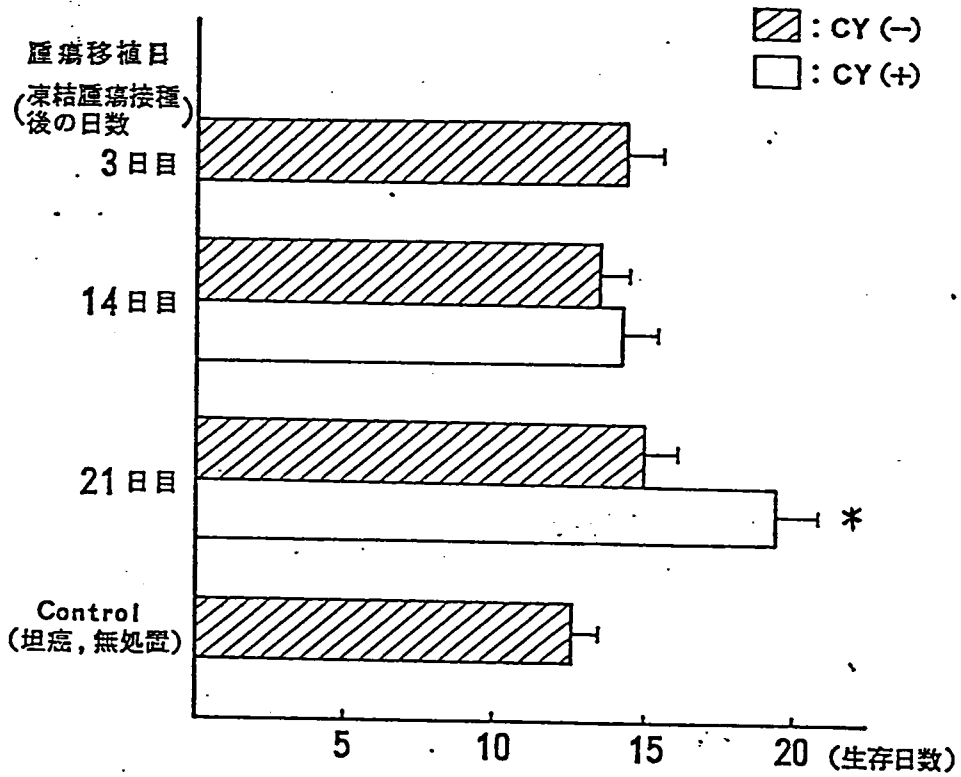
\*... Meth A 移植

Cryo-Meth A と Cyclophosphamide の併用効果



\*... Meth A 移植

凍結腫瘍細胞と Cyclophosphamide の延命効果



IL-2 活性

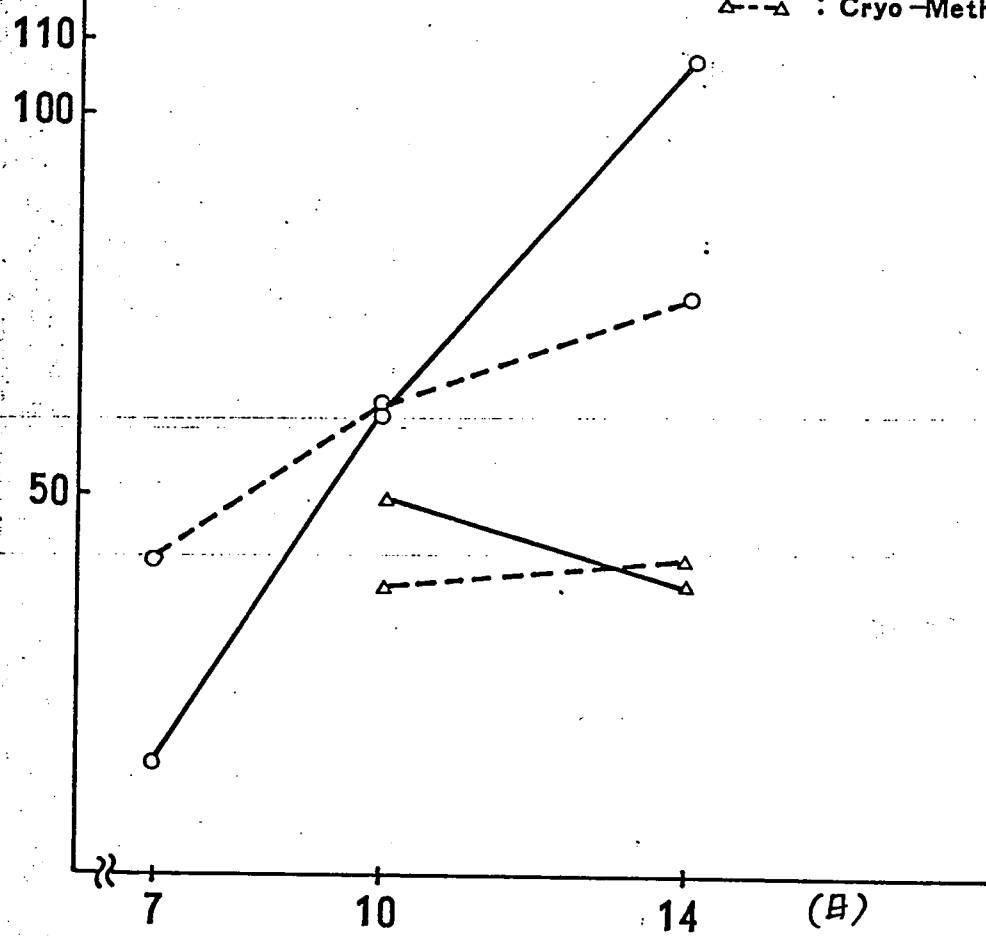
(unit)

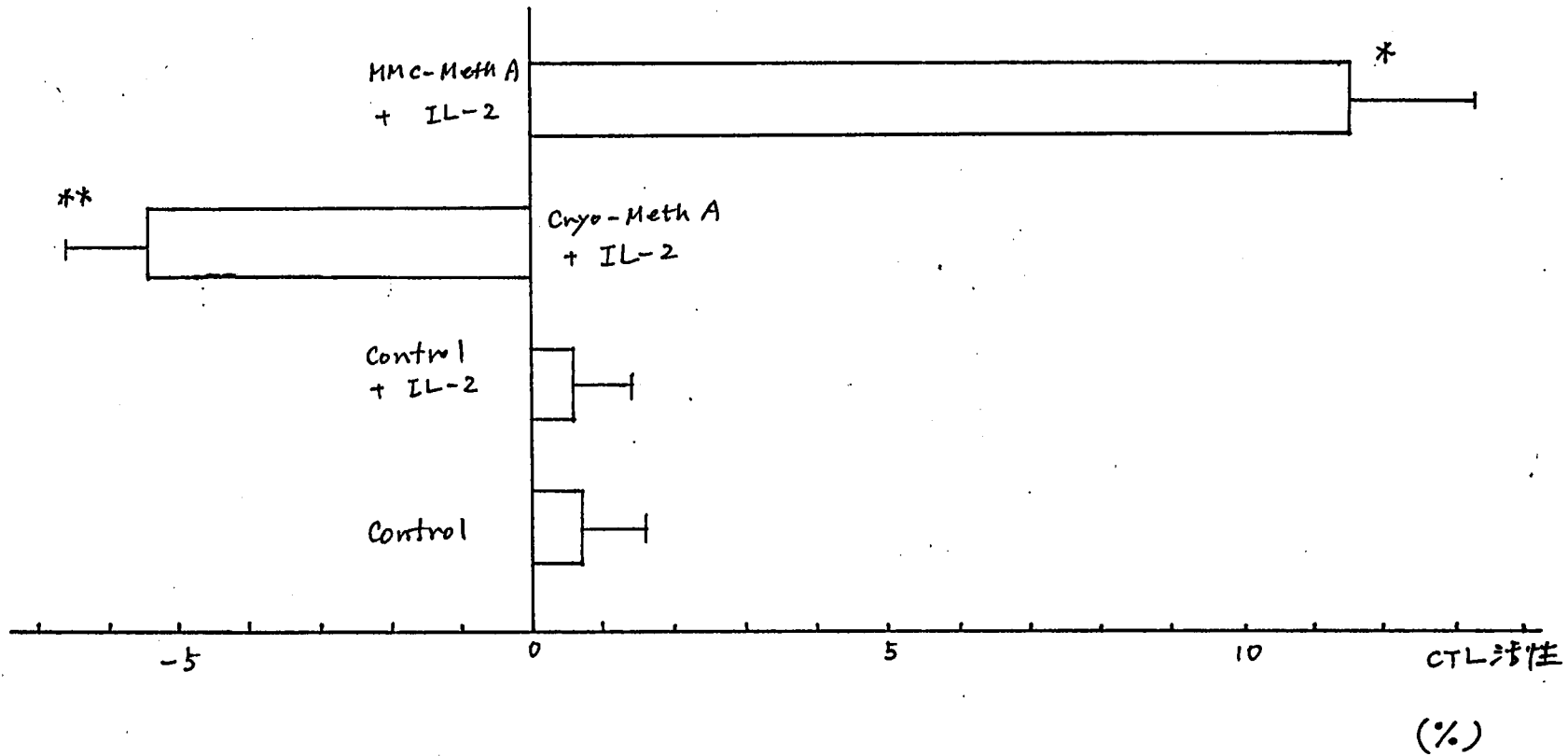
產生能 ○—○ : MMC-Meth A 群

○--○ : Cryo-Meth A 群

血中濃度 △—△ : MMC-Meth A 群

△--△ : Cryo-Meth A 群







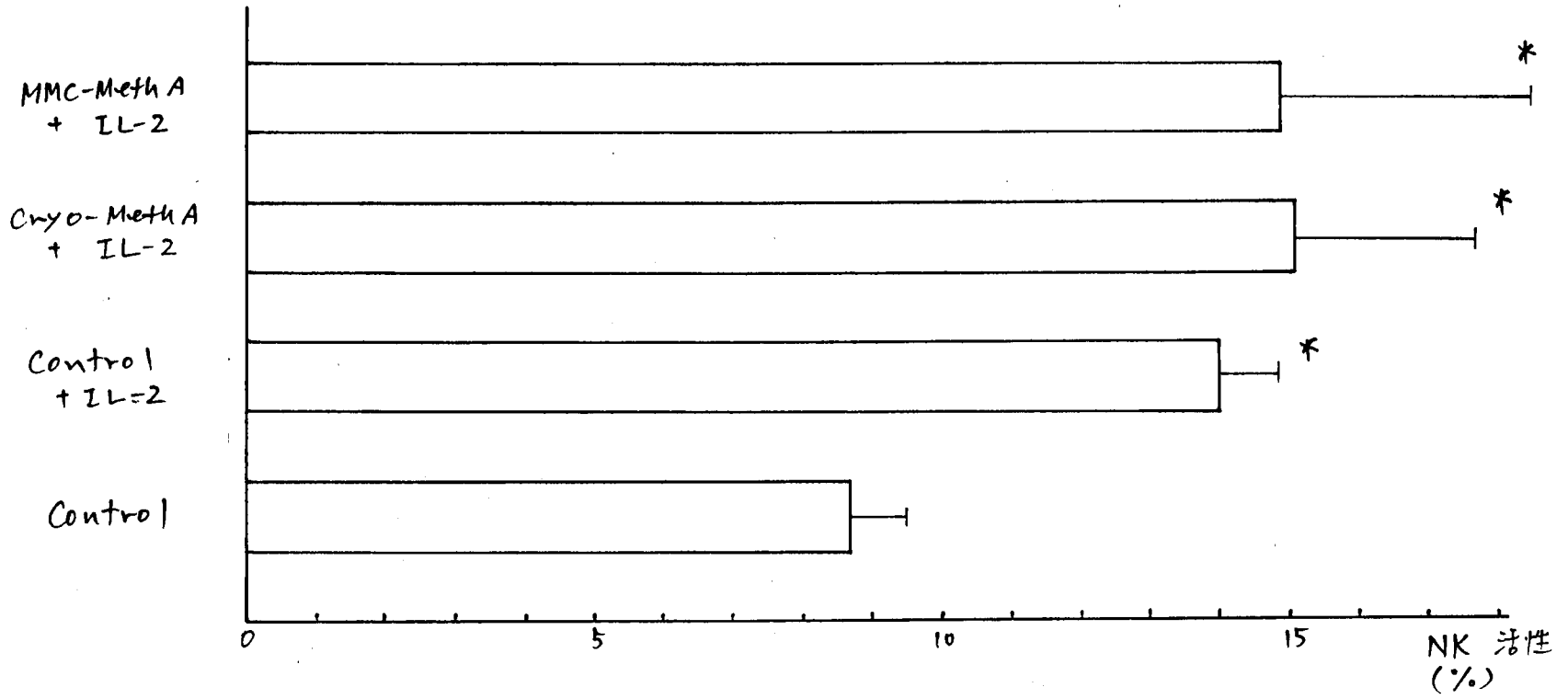
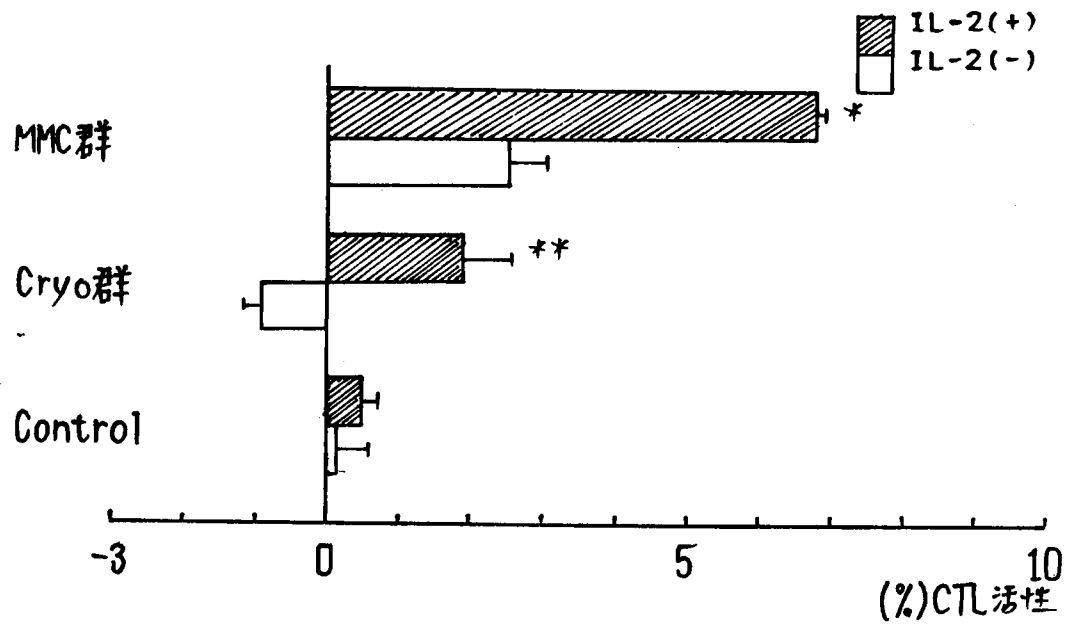


图 26



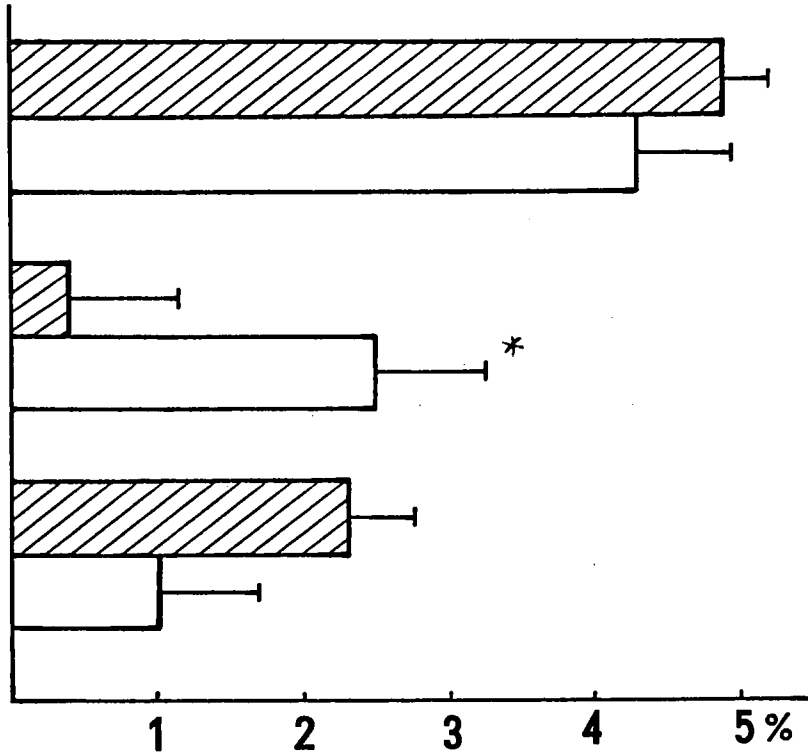
<二次刺激>

▨: 脾リンパ球  
□: 脾細胞

MMC-Meth A

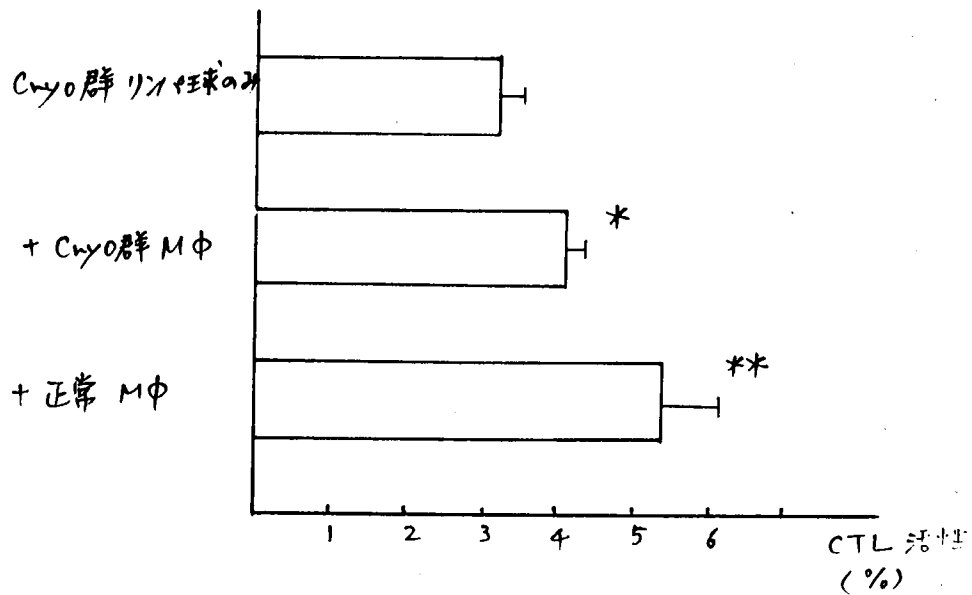
Cryo-Meth A

72L

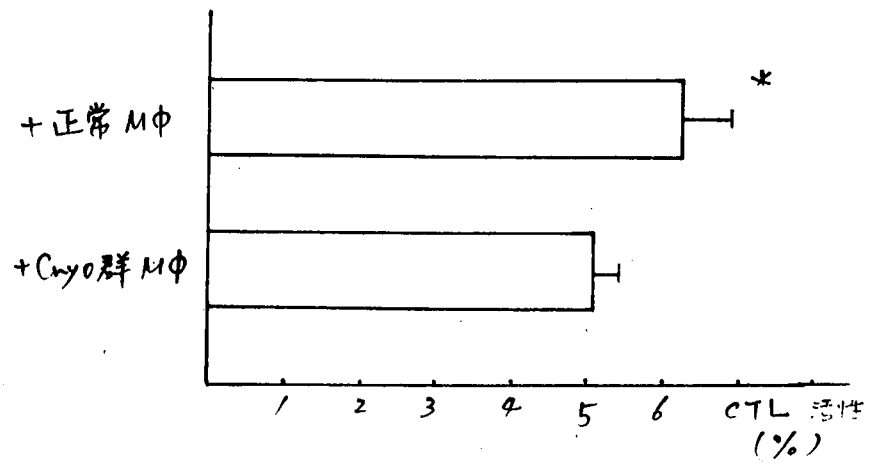


細胞障害活性

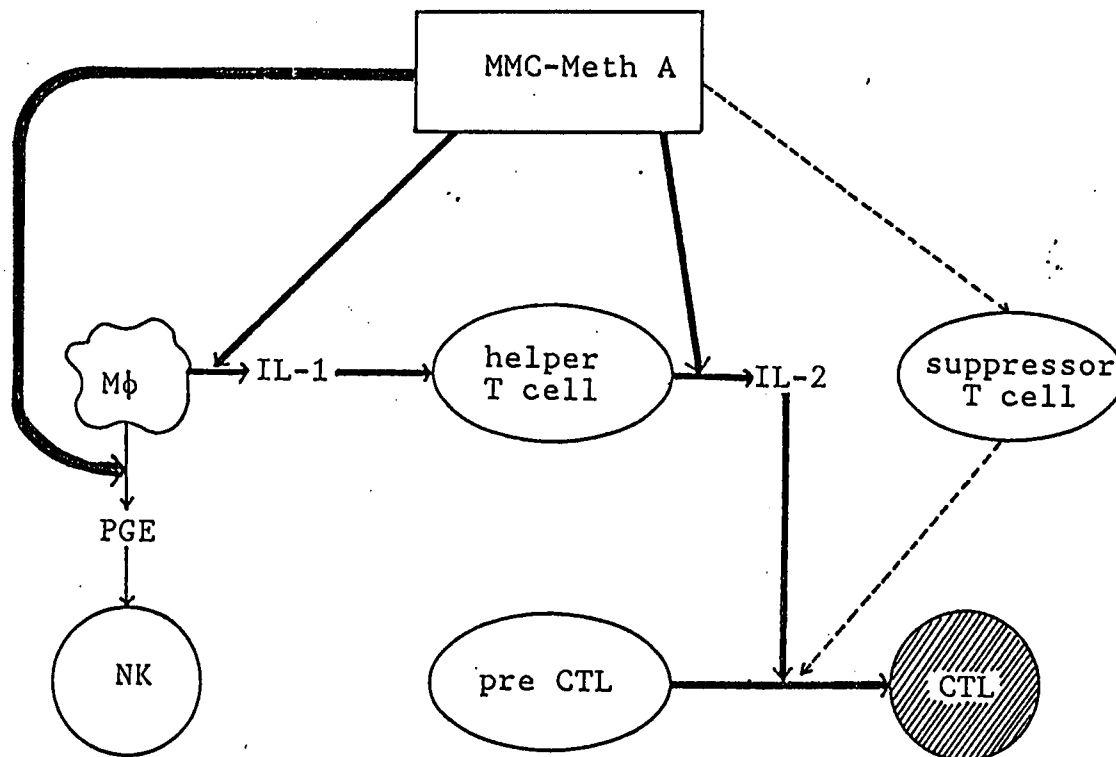
☒ 28 - (1)



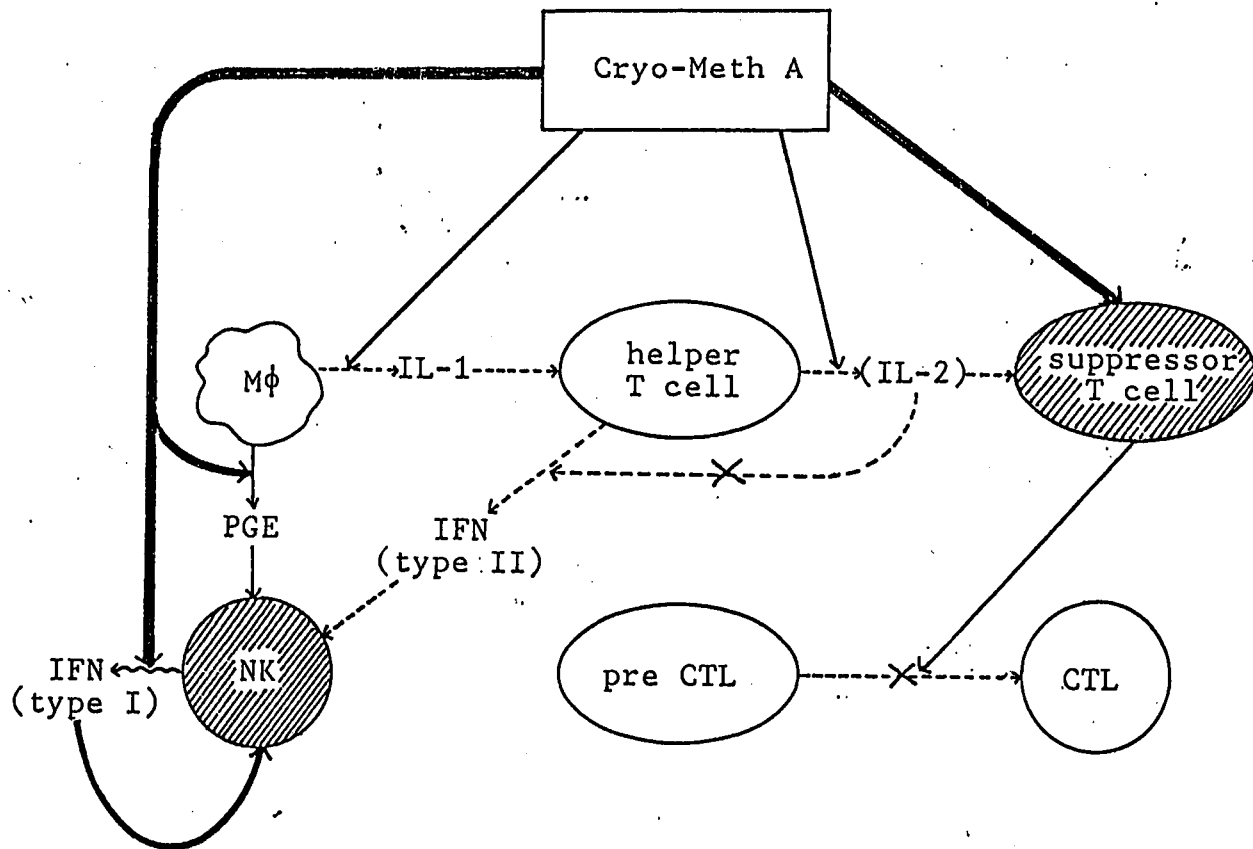
☒ 28 - (2)



☒ 29-(1)



☒ 29-(2)



## IL-2 消費試験

リンパ球	exogeneous IL-2	培養上清中の IL-2 (unit)
Cryo群	+	15 ± 1.5
Cryo群	-	0
MMC群	+	50 ± 0.4
MMC群	-	24 ± 4.3
None	+	47 ± 1.2

(平均値 ± S.D.)



表 2

インドメタシンの CTL 誘導におよぼす影響

グル-7°	CTL 活性 (%)	
	Indo (+)	Indo (-)
MMC-Meth A	7.0 ± 1.47	7.8 ± 0.87
Cryo-Meth A	4.8 ± 1.56	0.7 ± 0.35
Control	0.8 ± 0.87	0.1 ± 0.14

(平均値 ± S.D.)