The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	https://hdl.handle.net/11094/34630
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

No.

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）

(20×20)

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なわれていたが、1961年にCooperら[1]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[2](1965)、Emmingsら[3](1967)以来、各種疾患に応用され、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[4](1967)、Shulmanら[5][6](1968)およびRieraら[7](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[8](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[9](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[10](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[11)-16)]がある反面、抑制するという逆の報告[17)18)]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、さらにそ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 橋本嘉幸教授より恵与を受けた）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_2 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 (ethylendiaminetetraacetic 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1×10^7個/mlに調整し，φ15mmの試験管に入れ，そこにCRYOBARの凍結端子（プローベ）を挿入して－60°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(50μg/1ml PBS(-))にMeth Aを2×10^6個/mlとなるように浮遊して，37℃，5% 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残率は，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，軽くピペッ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[19]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[20]を用いた。すなわち，脾細胞 1×10^7 個を 5ml の培養液（RPMI1640,10%FCS）に浮遊させ，それを一晩4℃で FCS 処理したプラスチックシャーレに入れ，60分間37℃，5% 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℃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℃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 5×10^6 個を ^{51}Cr-Sodium chromate(Specific activity;0.24mCi/μg,Amersham, England) 50μCi を含む

RPMI1640 培養液(10%FCS)で3回洗浄し，2×10^5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[21]の^{51}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ェクター細胞(脾リンパ球)と標的細胞(YAC-1)を，それぞれ1×10^6個/0.1 mlおよび2×10^4個/0.1mlずつ加え(E/T ratio=50:1)，1 wellあたりの全量を0.2mlとして，37℃，5% CO_2培養器中で4時間，静置培養した。なお，対照には，エフェクター細胞を含まない培養液0.2mlを分注した。培養終了後，各wellより上清の0.1ml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0.2mlのうち0.1mlのみを測定しているので，すべて2倍し，それをそれぞれcpm of experimental releaseおよびcpm of control releaseとして次式に代入して，% of

specific release を算出し、その値を NK 活性とした。

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

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、およびエフェクター細胞を後述（12.抗体処理参照）のように抗アシアロ GM_1 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[22]の方法を一部改変[23]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 3×10^4/0.2 ml ずつ加え、一晩培養して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（2^0～2^{-9}、場合によっては2^0～2^{-18}）を0.1 mlずつ加え、37℃、5% CO_2 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MEM培養液（5%CS）で100 $TCID_{50}$/0.1ml 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、各サンプルに付き4個のwellを使用した。判定して得たデータよりReed-Muench法[24]によって50%阻止濃度を計算した。また、各実験ごとに同

時に標準インターフェロン（ここでは、Enzo-biochem 社, USA, IFN(α & β), 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. プロスタグランディン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_1 および PGE_2 をアルカリ処理によって、それぞれ PGB_1 および PGB_2 に変え、PGB_1 に対する抗体を用いて測定するもので、PGB_1 については100％測定できるが PGB_2 については抗体の交叉反応性が約30％であることから、PGE_1 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[25]の Co-stimulator assay の変法[26]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 20×10^6/ml に調整した。この胸腺細胞浮遊液 50μl, サンプル 100μl および Concanavalin A(Con A,Sigma chemical Co., 1.2μg/ml) 50μl を 96 穴の平底プレートの各 well に加え、37℃, 5% CO_2 培養器で培養し、48時間後に [^{3}H]-thymidine(specific activity;8.3mCi/mg, Amersham, England) を各 well に 1μCi 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 ml のシンチレーター液を加えて Liquid scintilation 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ない、赤血球を除去したのち、Hank's balanced salt solution (HBSS) で洗浄し、Con A

5μg/ml を含む RPMI1640 培養液（10% FCS 2-mercaptoethanol 5×10^{-6}M，HEPES 10mM を添加）で 4×10^{6}個/ml に調整し、37℃，5% CO_2 培養器で15時間培養した。培養後，15,000×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（0.22μm）にて濾過滅菌し、−20℃で保存した。

(3)単位の決定

(2)で作製した標準品を 100 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}〜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 5×10^{6}/ml に調整し、その 0.1 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 1×10^4個/0.1 ml ずつ加え，37℃，5% 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 を吸引除去し，そこに ^{51}Cr でラベルした Meth A 1×10^4/0.1 ml を加え，12時間培養して，CTL 活性の測定を行なった。

12．抗体処理

(1) 抗アシアロ GM1 抗体[27),28)]

NK 細胞の除去には，ウサギ抗アシアロ GM1 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，1×10^7 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℃，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℃，

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1×10^7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

MMC-およびCryo-Meth Aの1×10^6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日目に一過性の上昇があるが，MMC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に比べ、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，3×10^7/10 ml に調整して，プラスチックシャーレに入れ，37℃，5% 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いのに対し，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（α＆β）（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3×10^7/10mlに調整してプラ

スチックシャーレに移し、そこにMMC-Meth Aまたは Cryo-MethA 3×10⁶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(αまたはβ型)はpH 2に対して安定であるが、type IIインターフェロン(γ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.で用いたものと同一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）1×10^{-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群では上昇し、Cryo群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_1およびE_2）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3×10^7個/mlの培養液中にPGE（E_1またはE_2）(Sigma chemical, USA)を1000pg/ml,5000pg/mlまたは1μg/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_1およびPGE_2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_1およびE_2）の同時投与の効果を調べた。これは、正常マウスにIFN（α&β）100ユニットおよびPGE_1またはPGE_2 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_1またはE_2）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つの経路のある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、②pre CTLからCTLへの分化を妨げるという2つの特徴をもつことが示された。このような作用を持つものとして、サプレッサーT細胞の関与が考えられる。

10、サプレッサー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 ($2x10^7$/10ml)

b) MMC群10日目のリンパ球 ($2x10^7$/10ml)
＋ Cryo群3日目のリンパ球 ($2x10^7$/10ml)

c) MMC群10日目のリンパ球 ($2x10^7$/10ml)
＋ Cryo群10日目のリンパ球 ($2x10^7$/10ml)

これらを、37℃、5% 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プレッサー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，$Lyt\text{-}1^{-},2^{+}$ の phenotype[29～32] 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）[33～37] 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 1×10^6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[38～41]。また，NK細胞に対する増強因子としても注目されている[42～44]。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あらわれなかった。

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-MethAの接種の有無にかかわらず若干の増強を認めたが、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消費試験を行なった。

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 1×10^7 個/5ml に調整し、24時間37°C、5% 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であったが、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。

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ないことが示唆された。

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いが、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に対する細胞

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2×10^7/ml、Mφは1×10^7/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の割合で加え、さらにMMC-Meth A 1×10^6/mlを加えて、37℃、5% 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[45)46)]が癌に対する免疫監視機構の存在をとなえて以来，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[47)]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[48)49)]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[50)51)]，および免疫反応を抑制する細胞や因子が出現すること[52-54)]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[4)11~15)55~58)]および動物実験や臨床における実際の効果についての報告[9)12)59~63)]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っ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ォカ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[64)65)]を設定しなければならない。一般に、細胞の破壊には−60℃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℃前後）・緩徐融解（毎分1〜10℃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℃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回のみとした。

凍結破壊した細胞と対比するために、マイトマイシンCで処理した腫瘍細胞を用いた。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な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ったからである。

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C57Bl/6マウスとLewis lung carcinoma(3LL)などの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ェロン（IFN）に関する報告が多く、NK活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、抗原であるCryo-Meth Aの直接作用とは考えにくく、Cryo-Meth A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）からも、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ことなどが報告されている[71]。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（α&β）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て問題ないと思われる。

Trinchieri ら[72]は、ヒト末梢血リンパ球を分画し、腫瘍細胞やヘルペスウィ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[73][74]。

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[66]は、NK 細胞が免疫学的特異受容体（V_H 遺伝子産物）を持っていないことや刺激後の 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えにくいと述べている。この考えに沿うならば、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えている。

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 活性の抑制を起こ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[75)76)]。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[77)78)]。そこで，本実験系における PGE の関与について調べた。なお，ここで用いたクリニカル・アッセイ社のキットは，前述のように PGE_1 を中心に測定するものである。PGE_1 の免疫系におよぼす影響[79)]については，PGE_2[78)] ほど多数の報告はないが，おおむね PGE_2 と同様の作用があるとされている。

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_1またはPGE_2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_1およびE_2）がそれぞれ別々に作用する以外にPGE（E_1およびE_2）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ると考えられる。実際、リンパ球の培養液中にPGE_1またはPGE_2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ているが、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 誘導能のゆえ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$^-$,2$^+$ 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プレッサーT細胞を誘導することが証明されており[53]、また液性の免疫抑制物質の出現[80]も報告されている。MMC群においてもCTL活性がたかだか10%程度であることから、サプレッサー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群ではサプレッサー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のサプレッサー 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[81]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プレッサーT細胞が誘導されることを確認し、CTLとサプレッサーT細胞とでは認識する抗原の違うこと、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[82]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[83)84)]されており、そ

の中には実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_1およびE_2）が挙げられる。PGE_2にサプレッサーT細胞誘導能があり、それがPGE_2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_2が$Fc\gamma^+$ T cellを誘導するという報告[85]やPGE_2処理をしたリンパ球からサプレッサー因子が放出されるという報告[86]があり，この説を裏付けている。しかし，逆の報告[87][88]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，

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の刺激を受けてヘルパー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。

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った。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

ず，CTL の誘導に利用されていないことは明らかである。Susskind ら[89]は，サプレッサーT細胞の CTL 誘導抑制の機序として，サプレッサーT細胞が IL-2 を消費するために 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[90)91)]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いと言える。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も明らかである。

しかし、実際に臨床で使用されているOK-432[92)]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ことが予想される。

一方、CTLについては、サプレッサー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プレッサー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は充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に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) プロスタグランディン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，サプレッサー 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 誘導経路が充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なっていないが，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、サプレッサーT細胞の誘導、インターロイキン2を介する経路の障碍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プレッサー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。

参考文献

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}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，斉藤早久良(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 simplemethod 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 Ⅱ（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 1. 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 Pfitzenmaier,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.JJNCI,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 Sehon,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) 池田公彦，大場直人（1978）：悪性腫瘍に対する凍結手術－特にImmunochemotherapyとの併用に関して－，低温医学，4，16－24．

60)Neel,H.B. and Ritts,R.E.(1977):Immunotherapeutic efeects 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 systhesis 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(室田誠逸編), 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出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 differnt 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(Mø-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 Fcγ 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 differentialeffects 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-destructed 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 onthe rise and fall of natural killer (NK) cell activity and cytotoxic T lymphocytes(CTL) was investigated after inoculation of cryo-destructed Meth A.

Cryo-destructed 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(α&β) 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}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GM$_1$抗体を用いてNK細胞を除去したこと、および混合培養の時間を12時間にしたことなどが異なる。

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（1/1～1/32）をつくり、図3のようにして^{3}H-TdRのとりこみを測定し、得られたcpmを縦軸に、希釈倍数（力価）を横軸にと

って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。

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

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　＊…$p<0.05$

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±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（α&β）の100ユ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±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±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±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ディンE産生能と血中プロスタグランディンE濃度

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日目にインドメタシン 1×10^{-6} M/匹を投与しPGEの変動を調べた。

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。

図17：PGE（E_1 および E_2）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_1 および E_2）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：サプレッサー 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±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 ± 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 ± 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ての実験

・有意差 *… $p<0.05$

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。

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。

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いた。（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±0.35 %)に比べ、有意($p<0.02$)のCTL誘導が認められた。

図 1

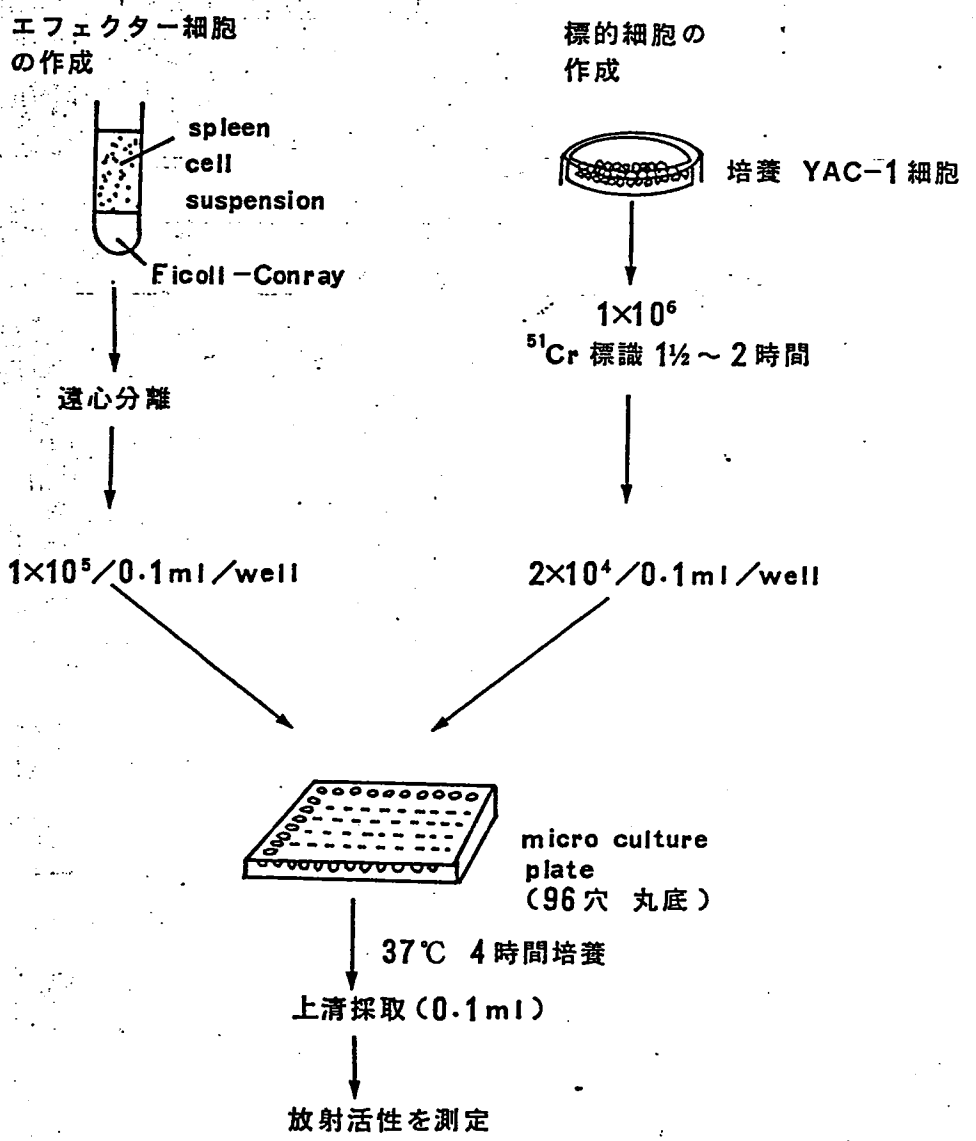

エフェクター細胞
の作成
spleen
cell
suspension
Ficoll −Conray
遠心分離
1×10⁵/0.1ml/well
標的細胞の
作成
培養 YAC−1 細胞
1×10⁶
⁵¹Cr 標識 1½～2時間
2×10⁴/0.1ml/well
micro culture
plate
(96穴 丸底)
37℃ 4時間培養
上清採取(0.1ml)
放射活性を測定

図 2

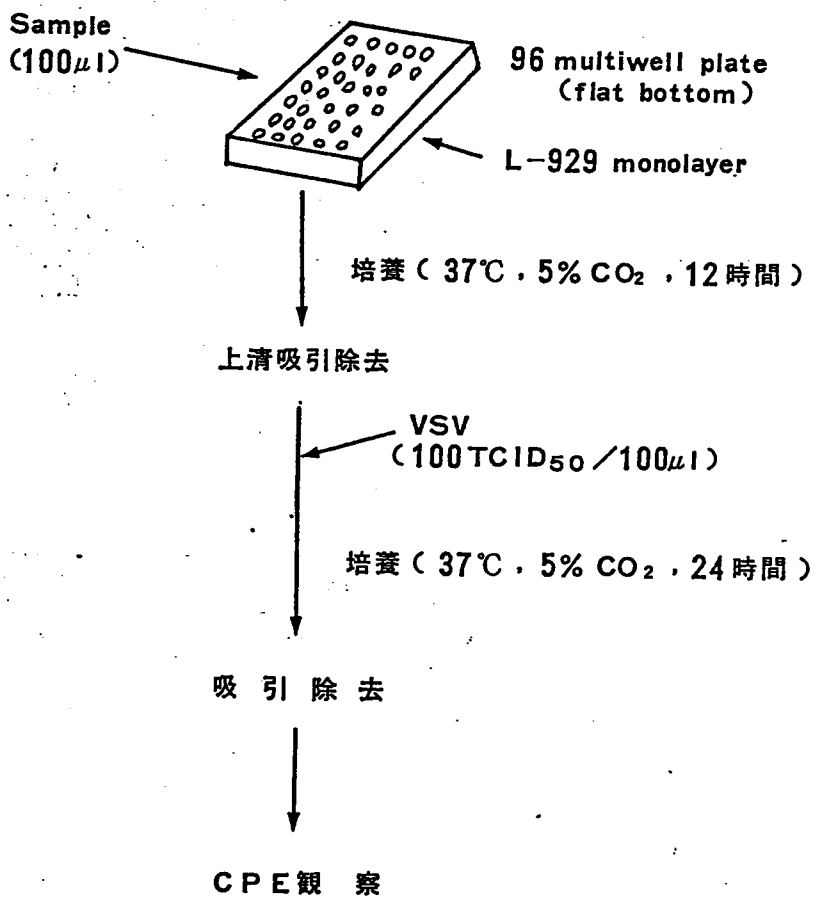

Sample
(100μl)
96 multiwell plate
(flat bottom)
L-929 monolayer
培養（37℃，5% CO_2，12時間）
上清吸引除去
VSV
(100 $TCID_{50}$/100μl)
培養（37℃，5% CO_2，24時間）
吸 引 除 去
CPE観 察

図 3

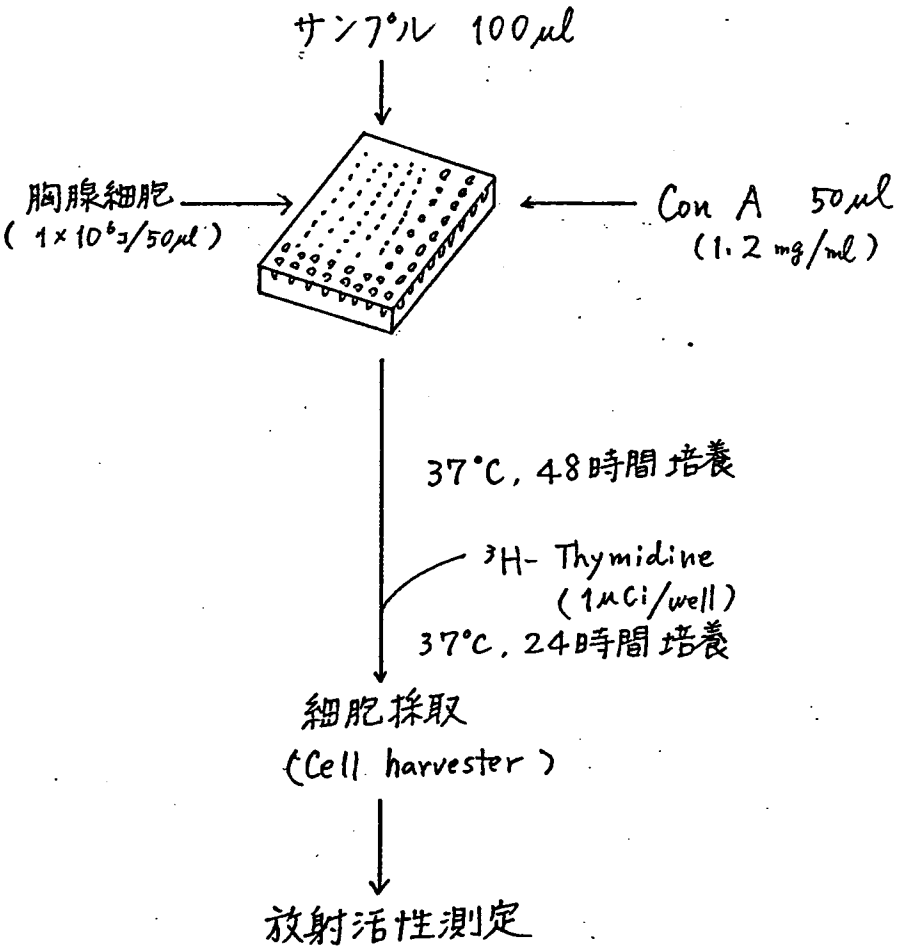

サンプル 100μl
胸腺細胞
(1×10⁶コ/50μl)
Con A 50μl
(1.2 mg/ml)
37°C, 48時間培養
³H- Thymidine
(1μCi/well)
37°C, 24時間培養
細胞採取
(Cell harvester)
放射活性測定

図4

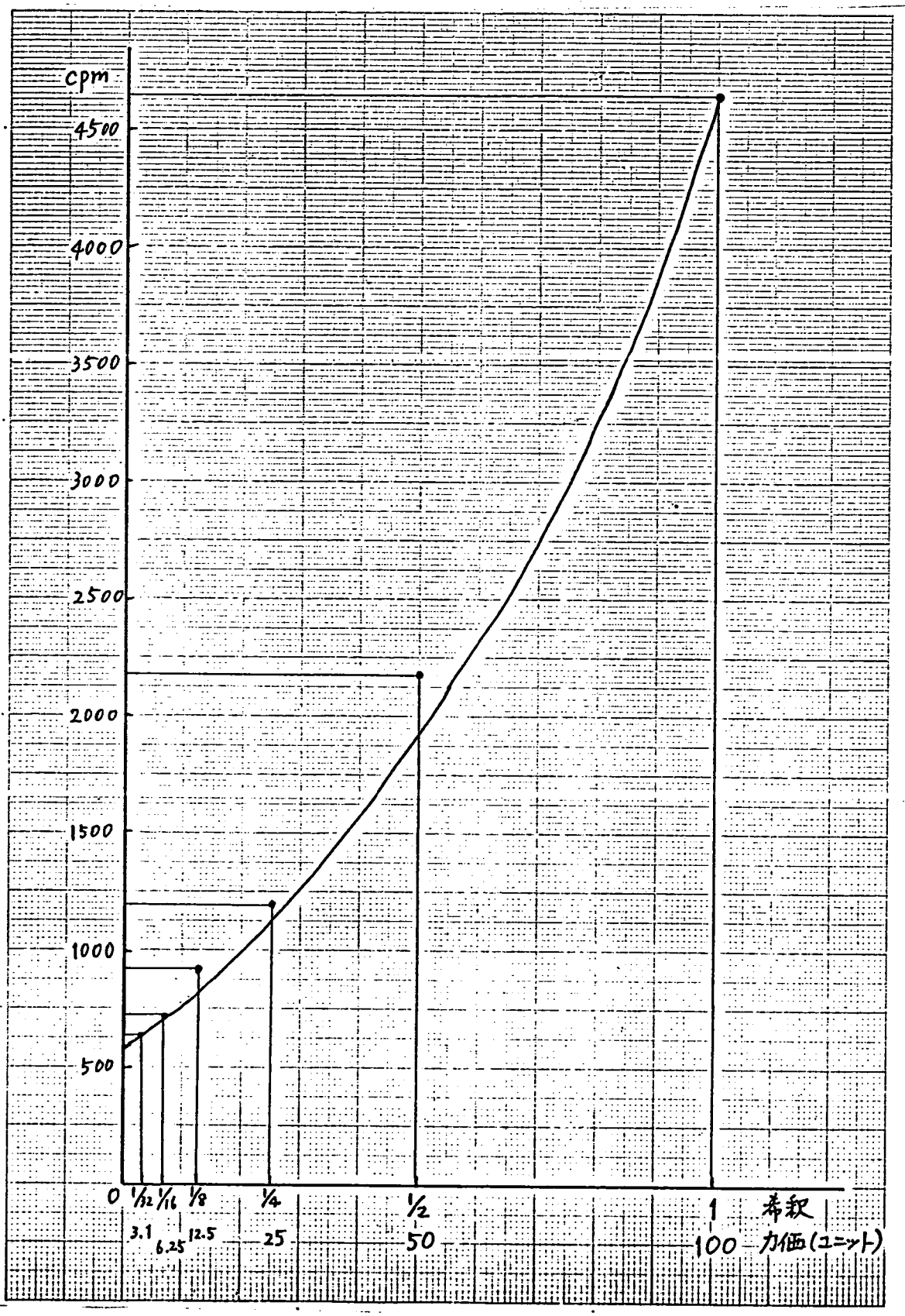

cpm
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1/32
1/16
1/8
1/4
1/2
1
希釈
3.1
6.25
12.5
25
50
100
力価(ユニット)

図 5

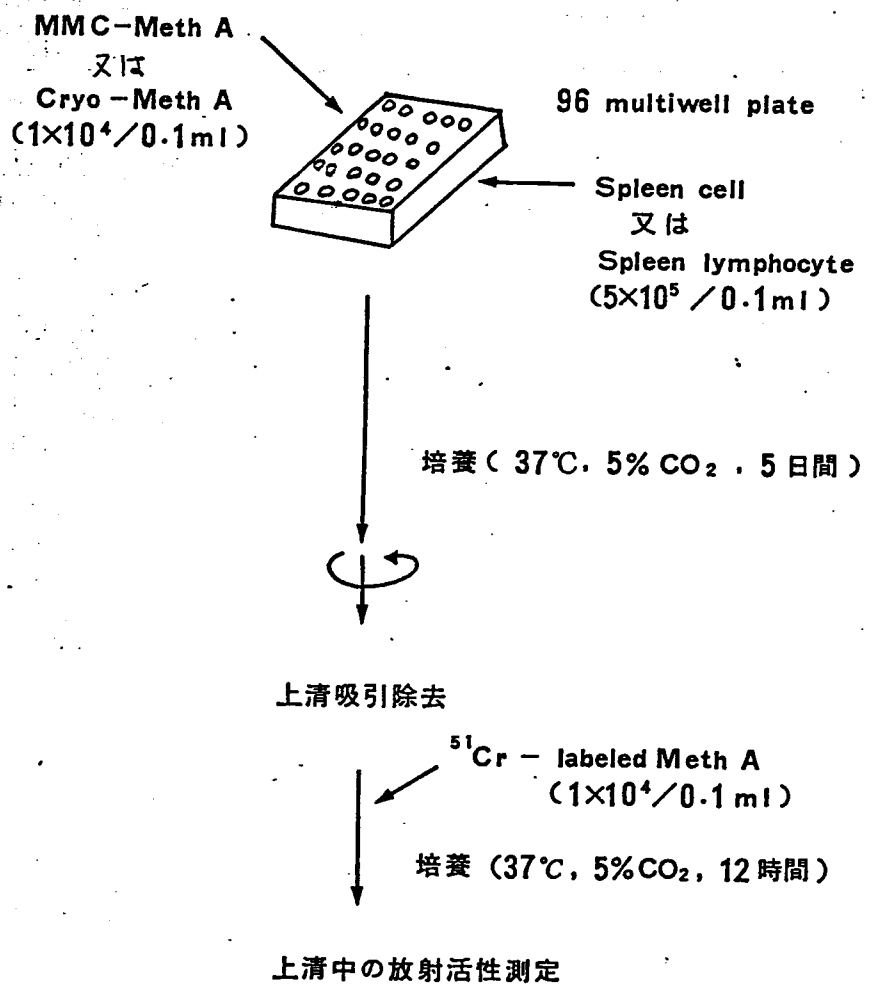

MMC−Meth A
又は
Cryo−Meth A
(1×10⁴/0.1ml)
96 multiwell plate
Spleen cell
又は
Spleen lymphocyte
(5×10⁵/0.1ml)
培養(37℃, 5% CO₂, 5日間)
上清吸引除去
⁵¹Cr − labeled Meth A
(1×10⁴/0.1ml)
培養(37℃, 5%CO₂, 12時間)
上清中の放射活性測定

図 6

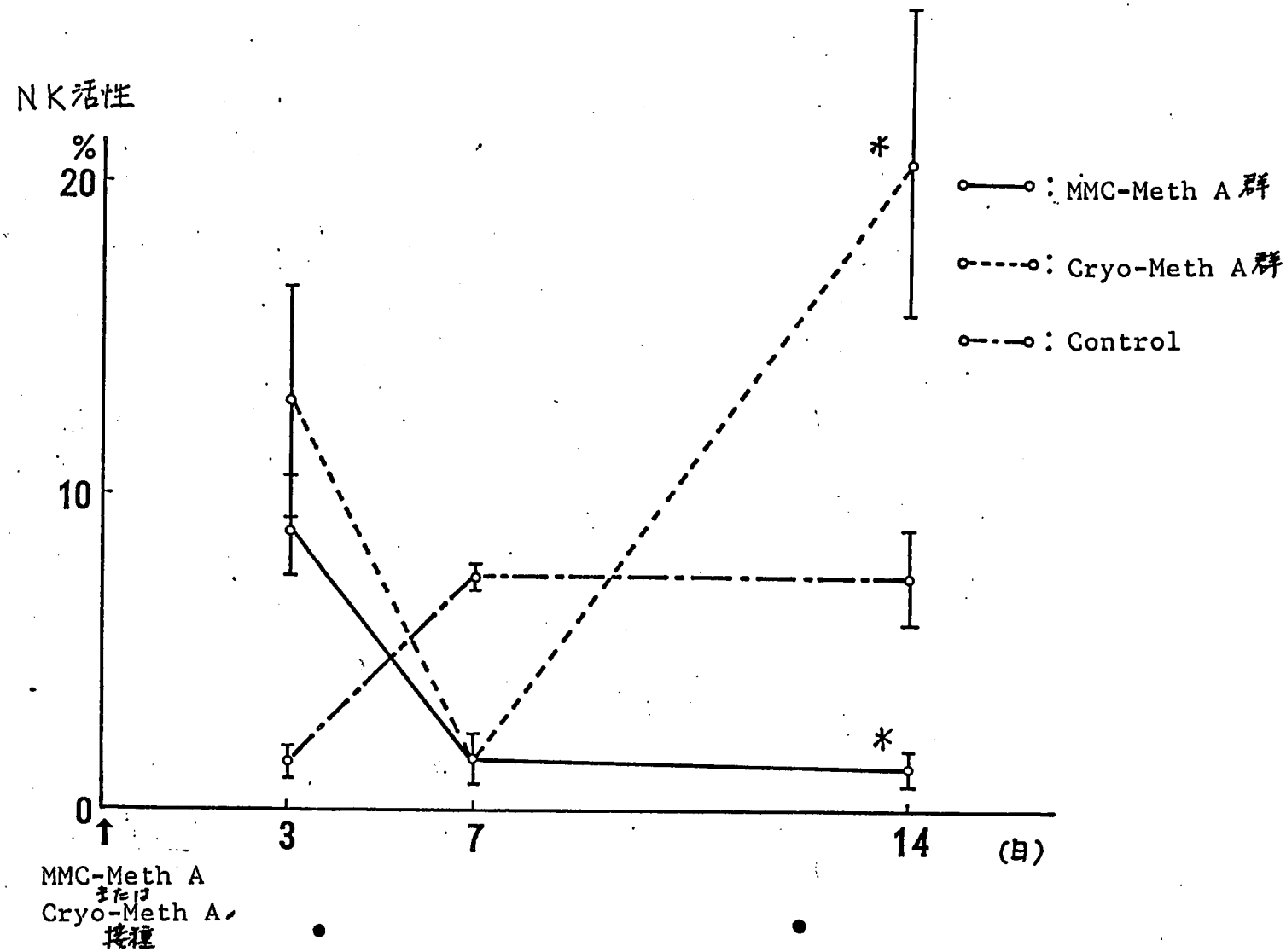

NK活性
%
20
10
0
3
7
14
(日)
MMC-Meth A
または
Cryo-Meth A
接種
*
*
: MMC-Meth A群
: Cryo-Meth A群
: Control

図 7

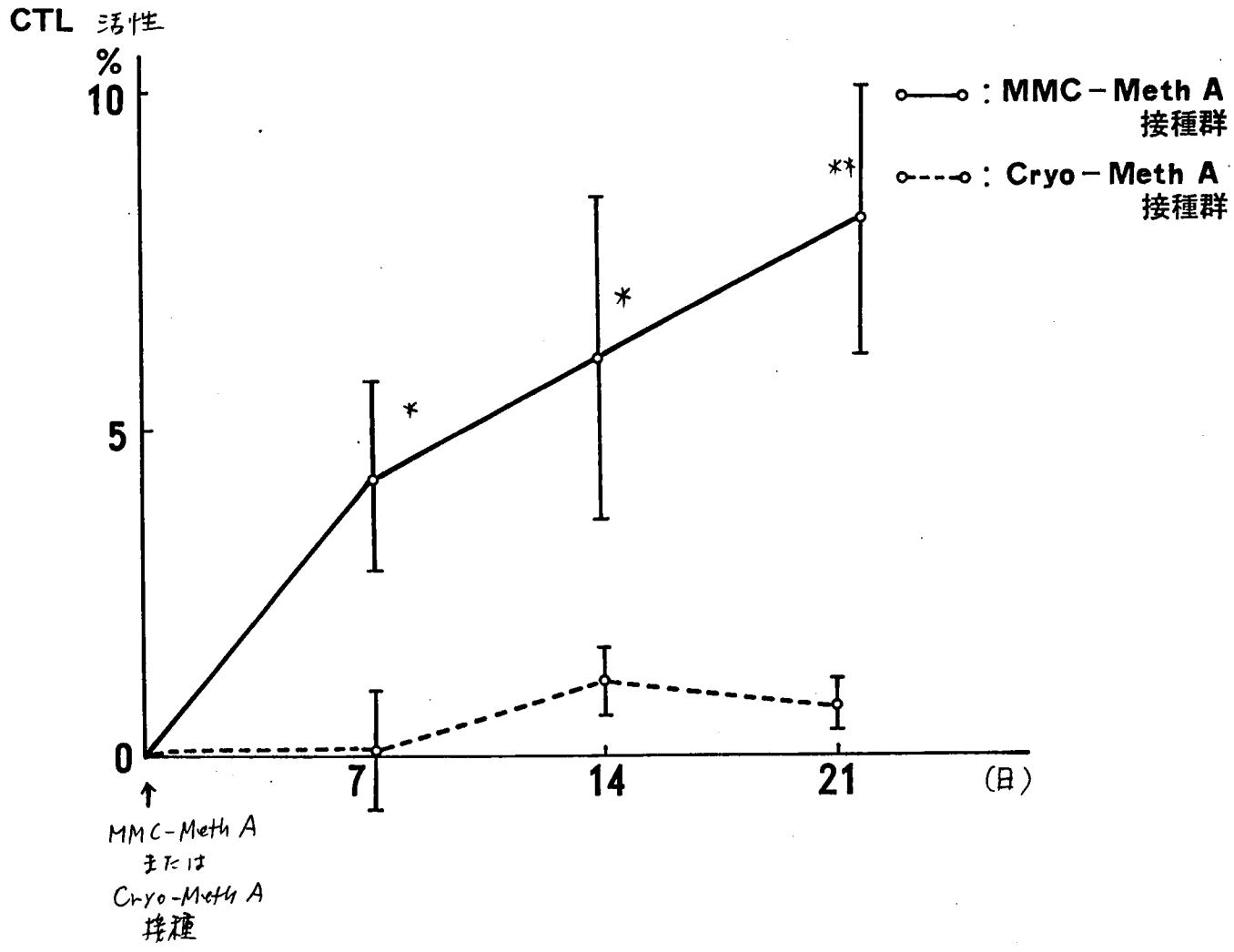

CTL 活性
%
10
5
0
7
14
21
(日)
*
*
**
: MMC－Meth A 接種群
: Cryo－Meth A 接種群
MMC-Meth A
または
Cryo-Meth A
接種

図 8

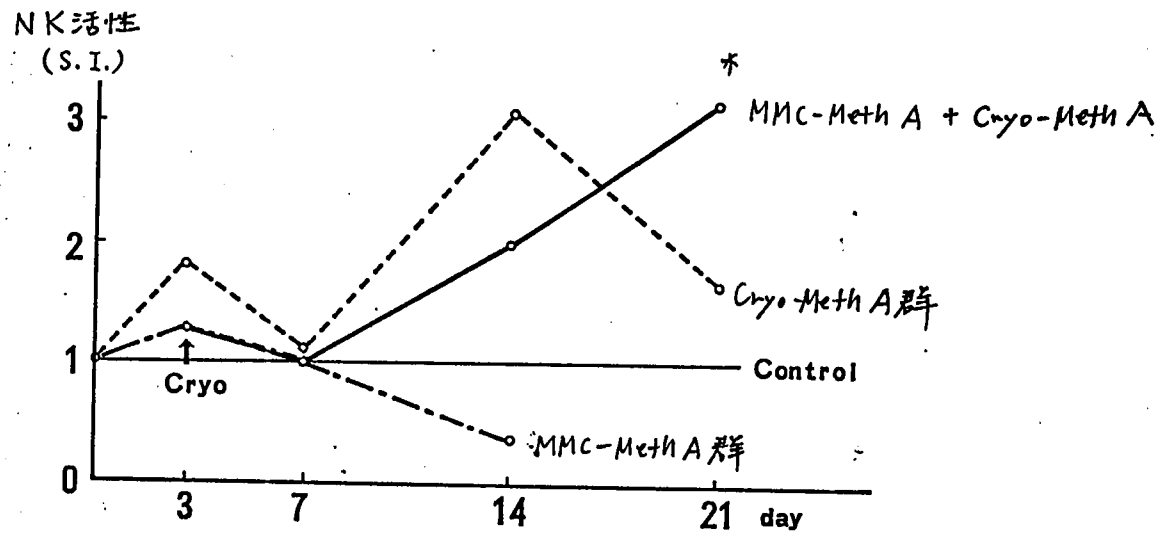

NK活性
(S.I.)
3
2
1
0
Cryo
3
7
14
21
day
*
MMC-Meth A + Cryo-Meth A
Cryo-Meth A群
Control
MMC-Meth A群

図 9

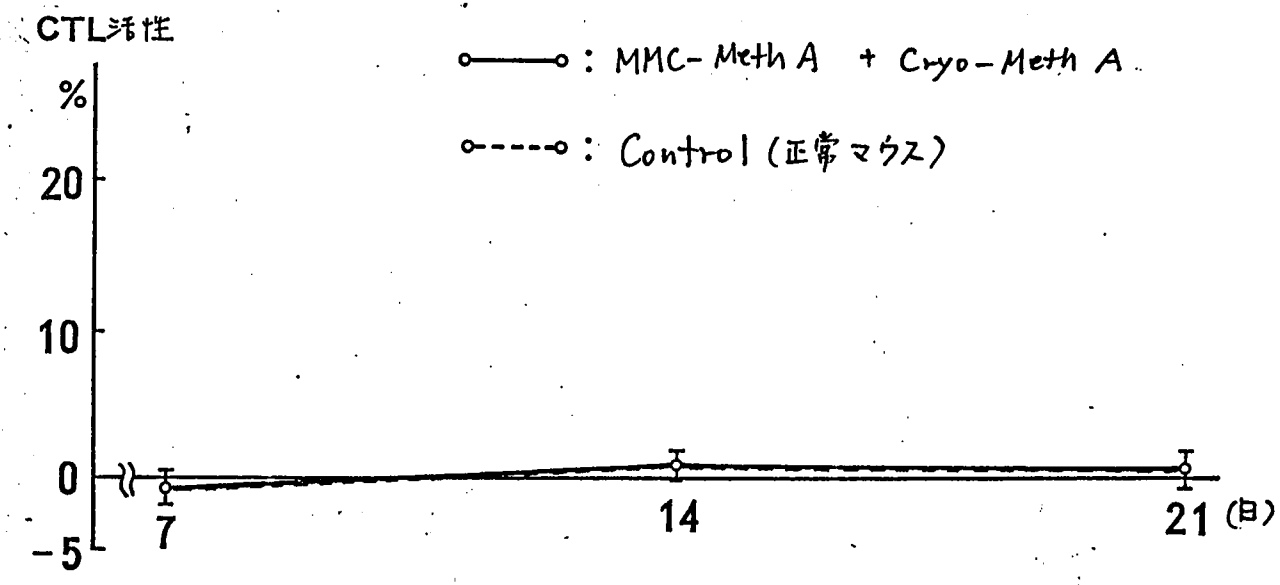


図 10

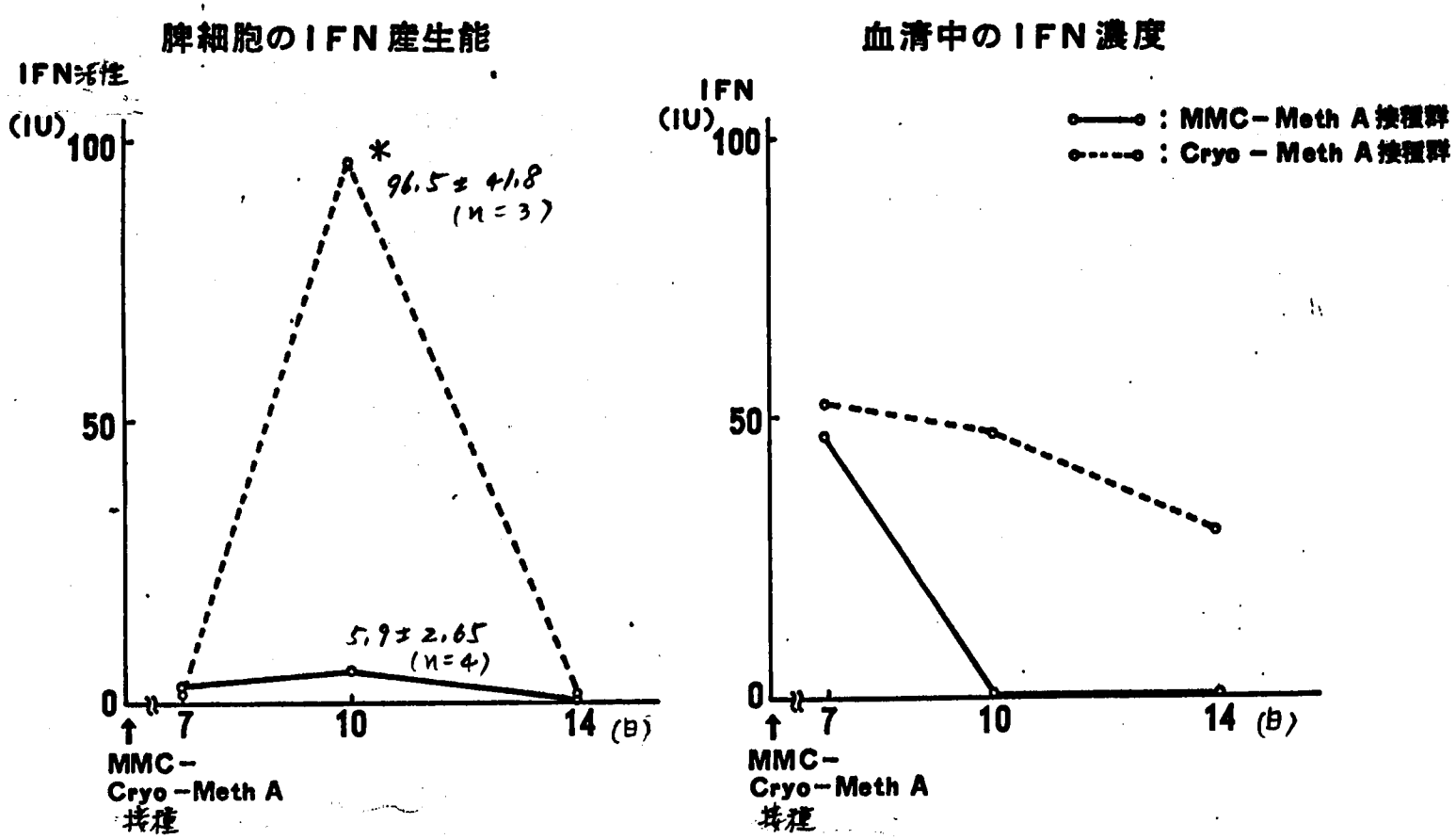

脾細胞のIFN産生能
IFN活性
(IU)
100
50
0
*
96.5 ± 41.8
(n = 3)
5.9 ± 2.65
(n = 4)
7
10
14
(日)
MMC−
Cryo−Meth A
接種
血清中のIFN濃度
IFN
(IU)
100
50
0
: MMC−Meth A接種群
: Cryo − Meth A接種群
7
10
14
(日)
MMC−
Cryo−Meth A
接種

図 11

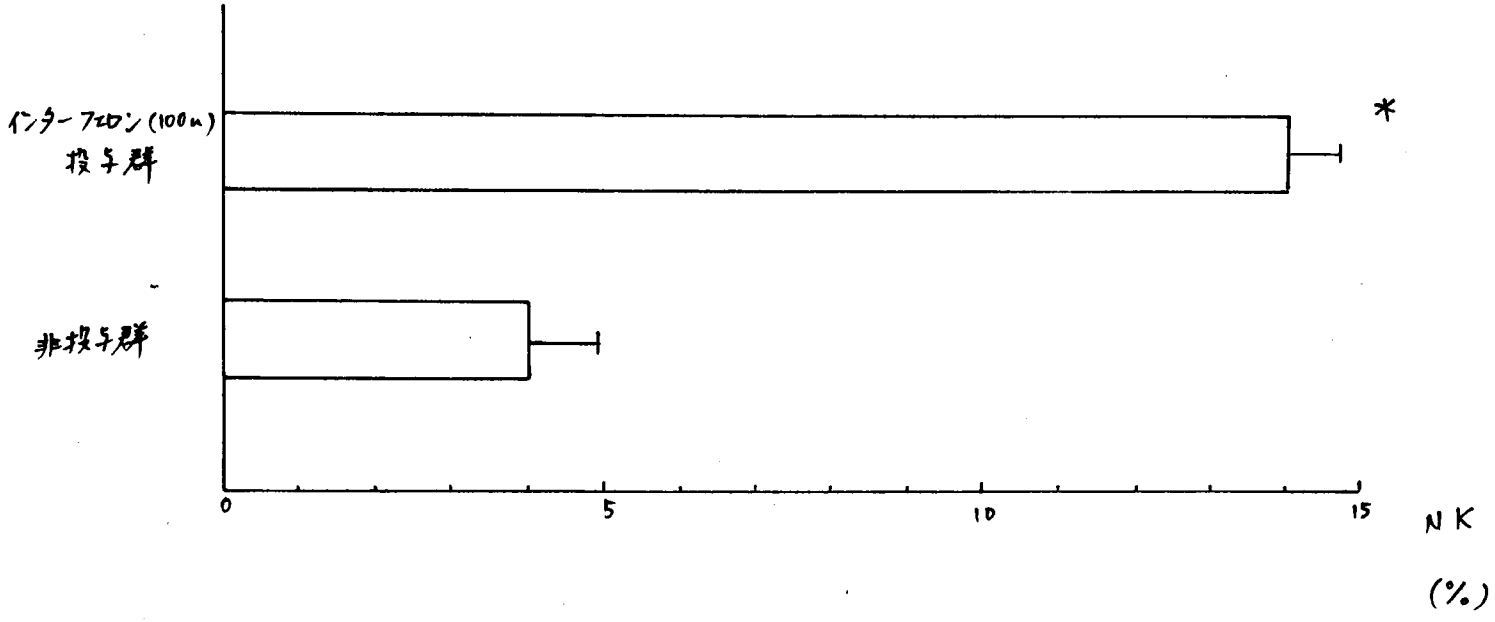


図 12

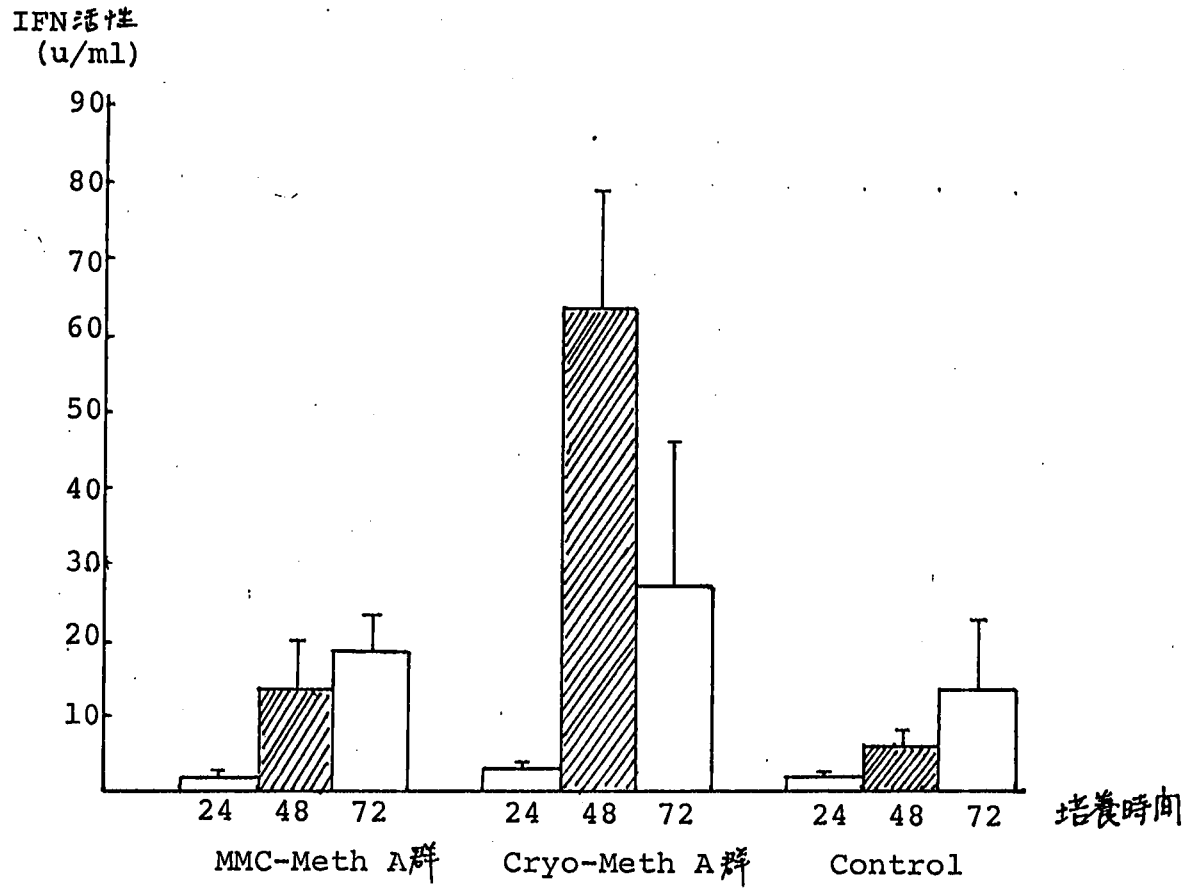

IFN活性
(u/ml)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
24
48
72
24
48
72
24
48
72
培養時間
MMC-Meth A群
Cryo-Meth A群
Control

図 13

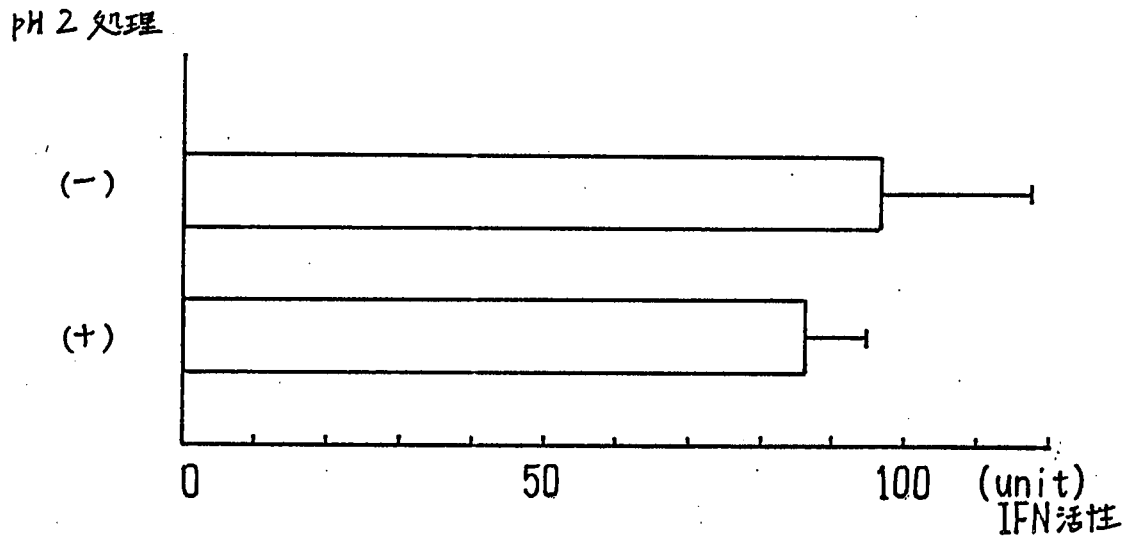


図 14

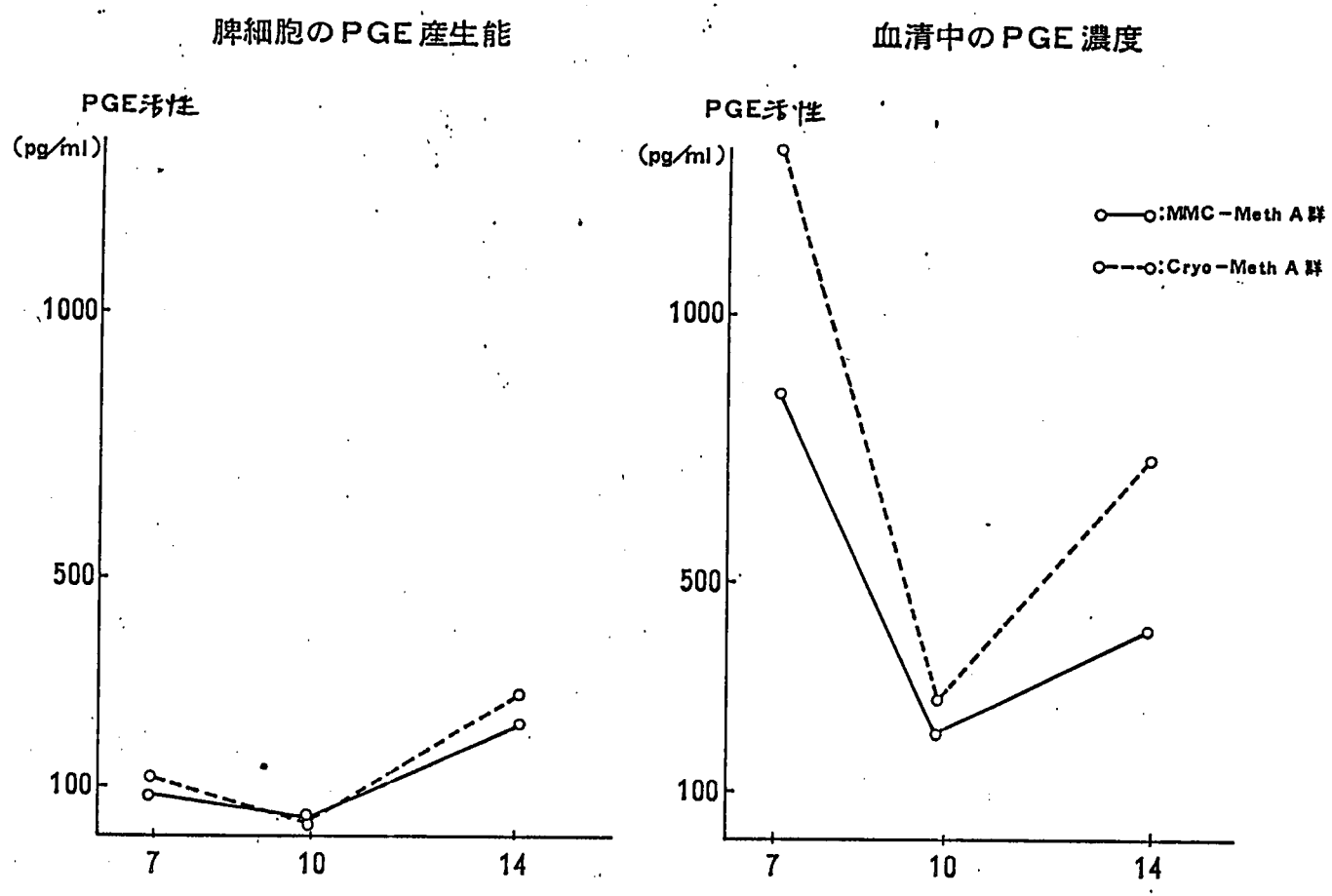
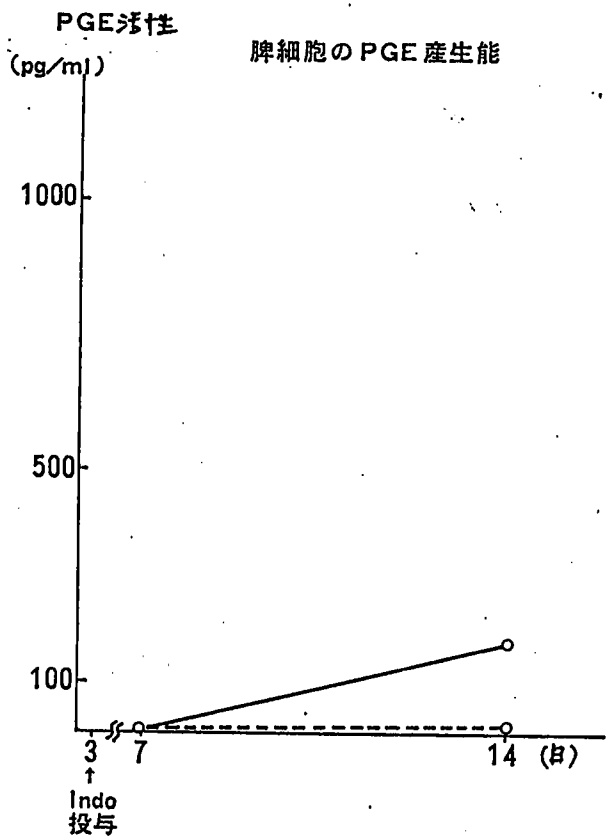

脾細胞のPGE産生能
PGE活性
(pg/ml)
1000
500
100
7
10
14
血清中のPGE濃度
PGE活性
(pg/ml)
1000
500
100
7
10
14
:MMC−Meth A群
:Cryo−Meth A群

図 15


PGE活性
(pg/ml)
脾細胞のPGE産生能
1000
500
100
3
7
14 (日)
Indo
投与

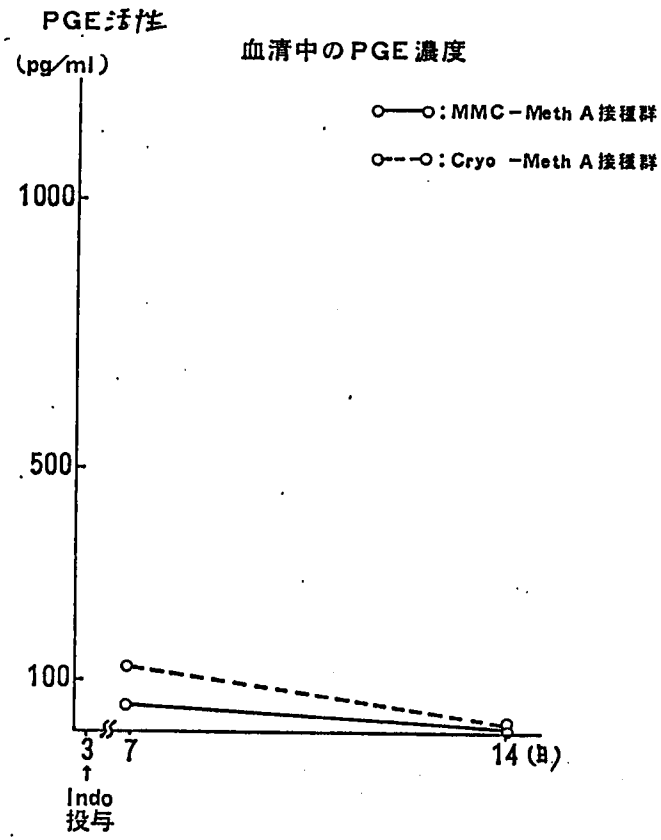

PGE活性
(pg/ml)
血清中のPGE濃度
○—○: MMC－Meth A接種群
○---○: Cryo －Meth A接種群
1000
500
100
3
7
14 (日)
Indo
投与

図 16

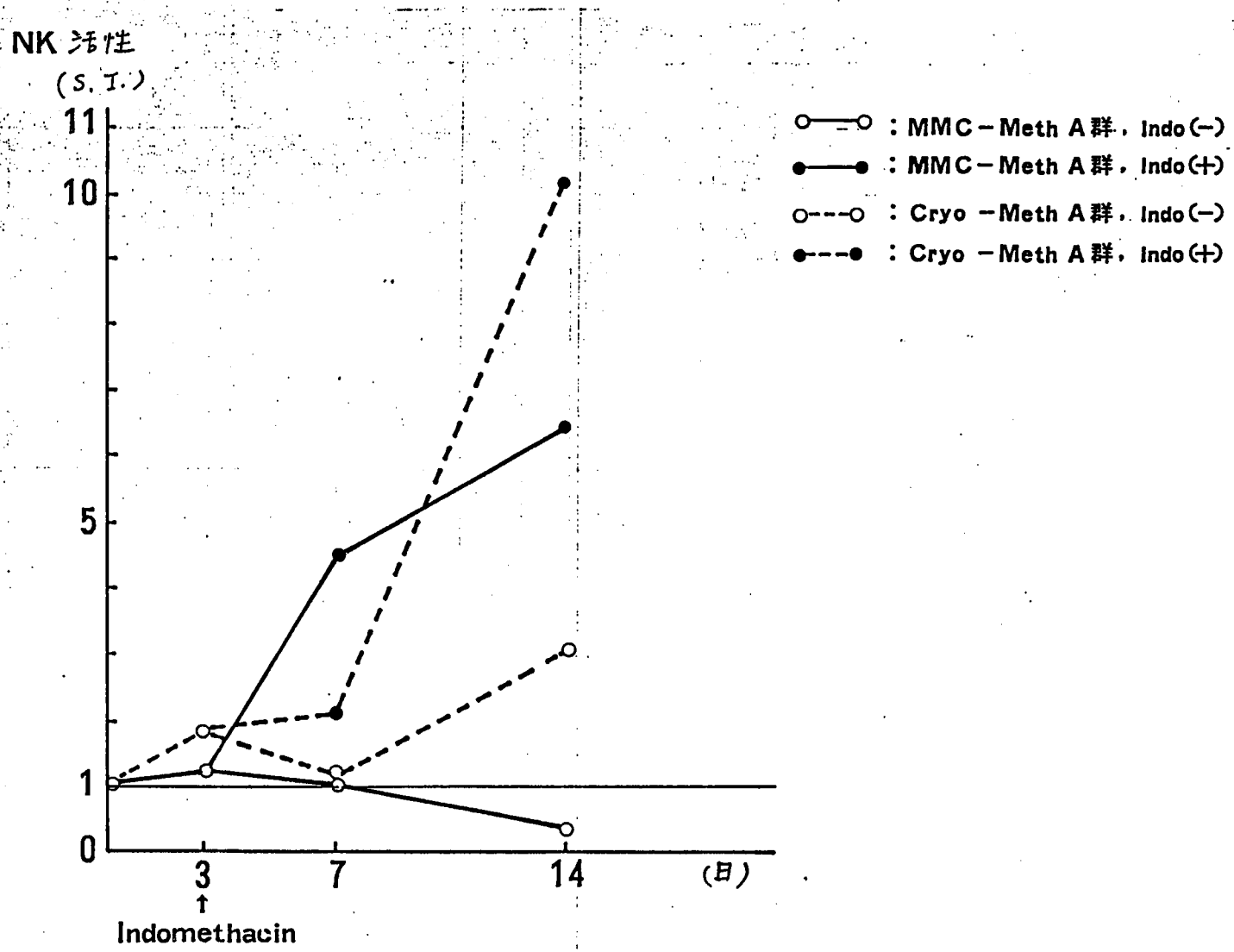
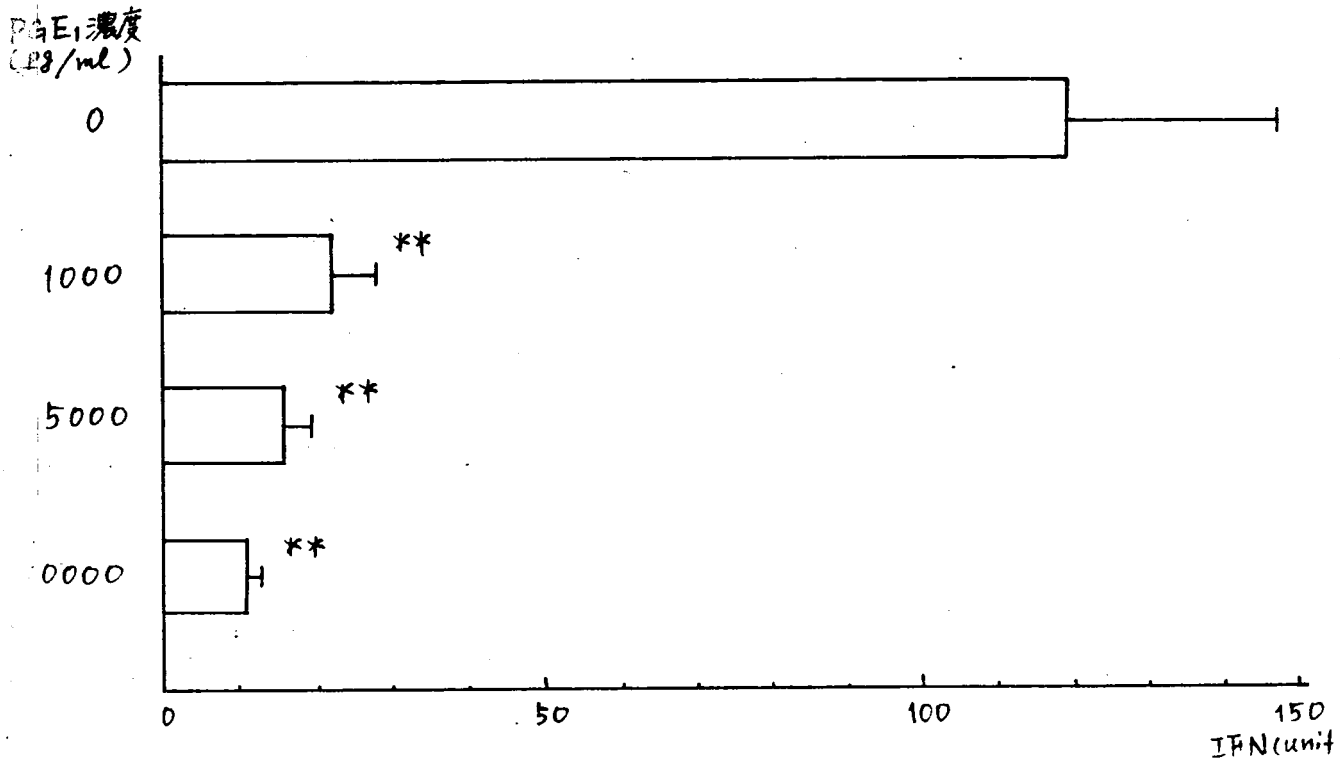

NK 活性
(S.I.)
11
10
5
1
0
3
7
14
(日)
Indomethacin
: MMC－Meth A群，Indo(－)
: MMC－Meth A群，Indo(＋)
: Cryo －Meth A群，Indo(－)
: Cryo －Meth A群，Indo(＋)

図17

図17


PGE1濃度
(pg/ml)
0
1000
5000
0000
**
**
**
0
50
100
150
IFN(unit

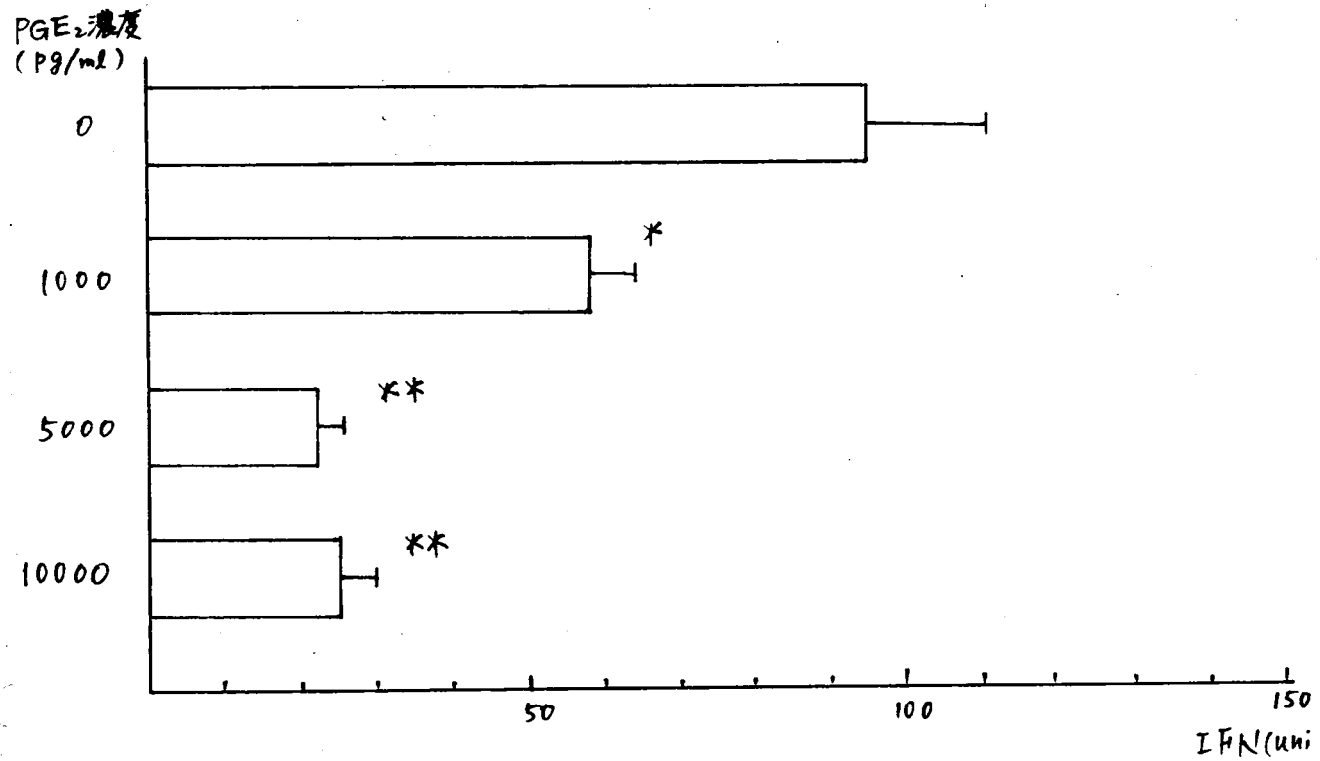

PGE2濃度
(pg/ml)
0
1000
5000
10000
*
**
**
50
100
150
IFN(uni

図 18

図 18

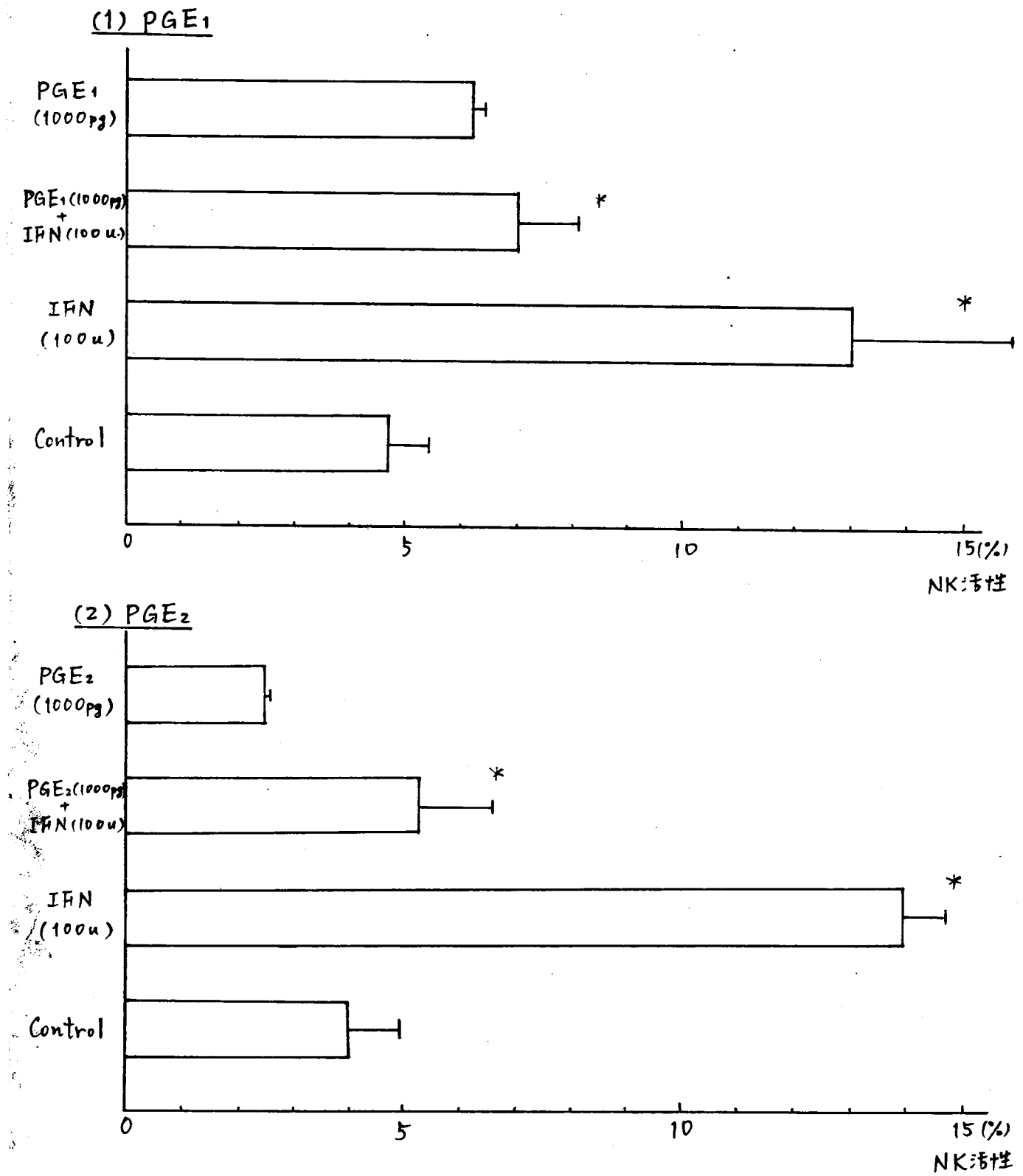

(1) PGE1
PGE1 (1000pg)
PGE1 (1000pg) + IFN (100u)
IFN (100u)
Control
*
*
0
5
10
15(%)
NK活性
(2) PGE2
PGE2 (1000pg)
PGE2 (1000pg) + IFN (100u)
IFN (100u)
Control
*
*
0
5
10
15 (%)
NK活性

図 19

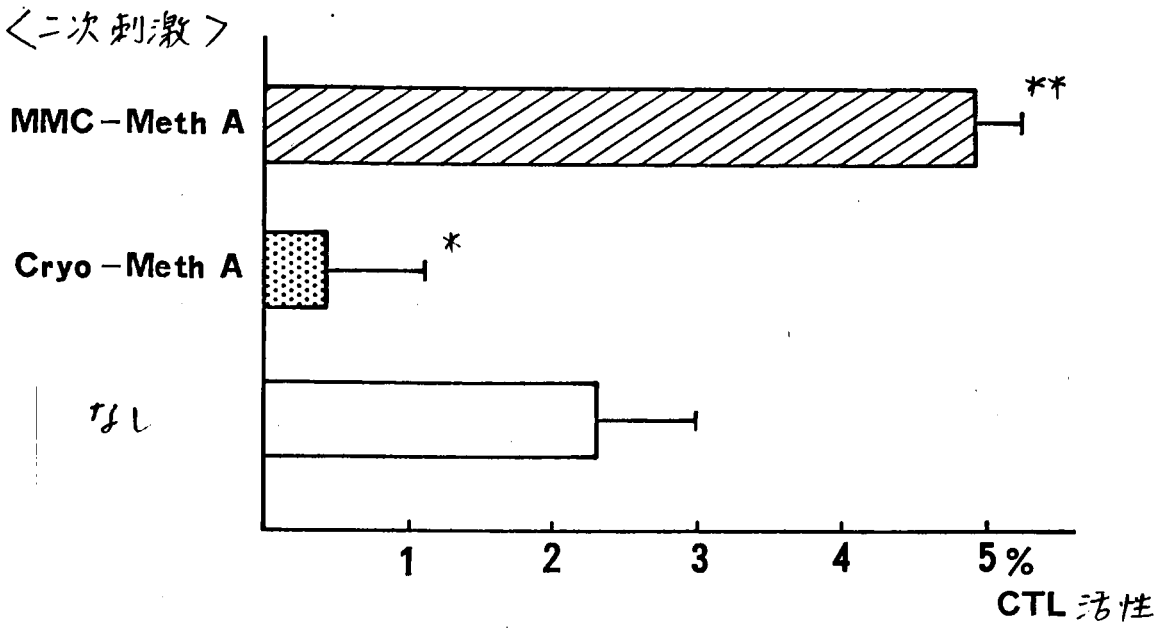


図 20 - (1)

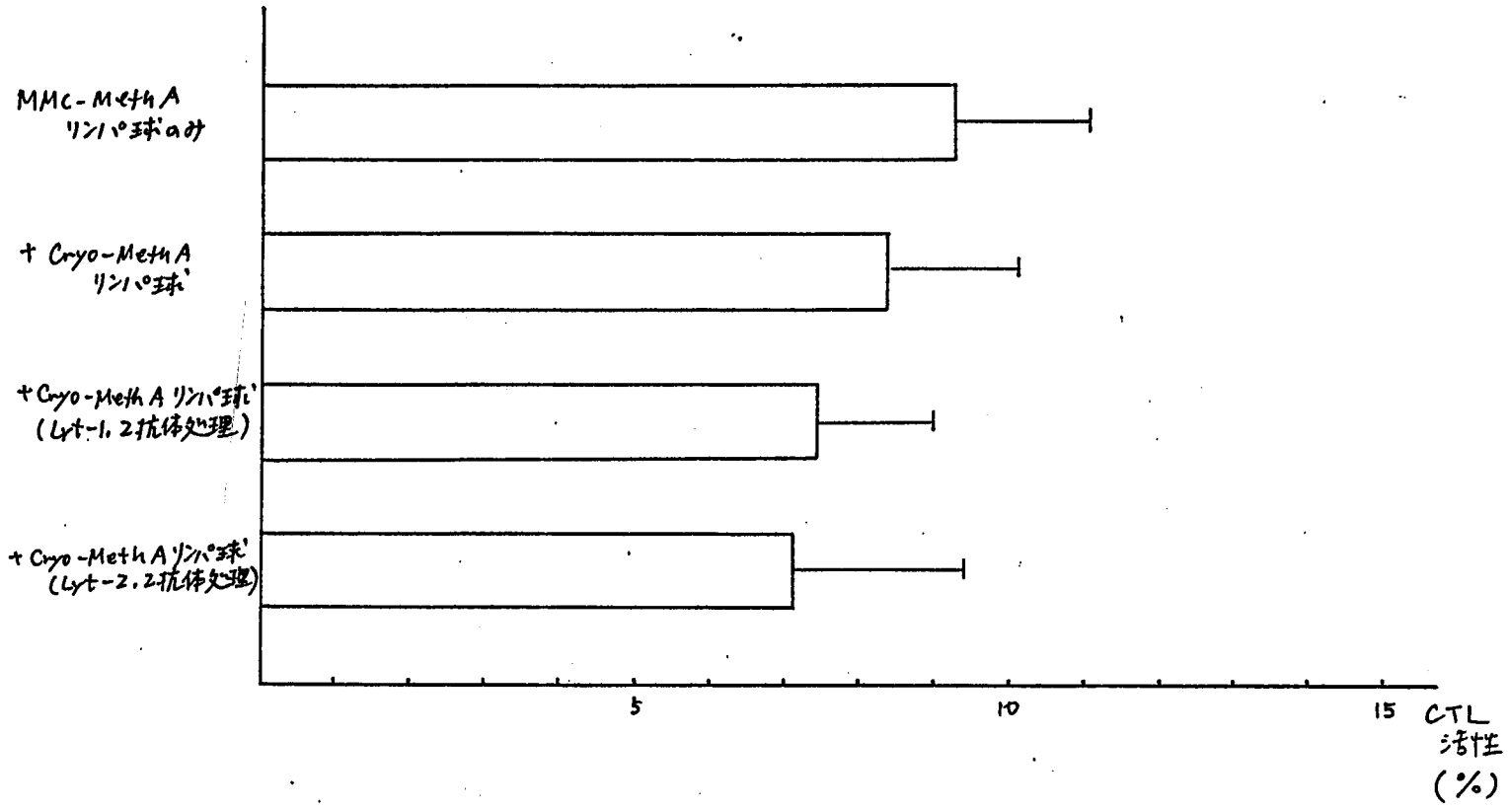

MMC-MethA
リンパ球のみ
+ Cryo-MethA
リンパ球
+Cryo-MethA リンパ球
(Lyt-1, 2抗体処理)
+Cryo-MethA リンパ球
(Lyt-2, 2抗体処理)
5
10
15
CTL
活性
(%)

図 20-(2)

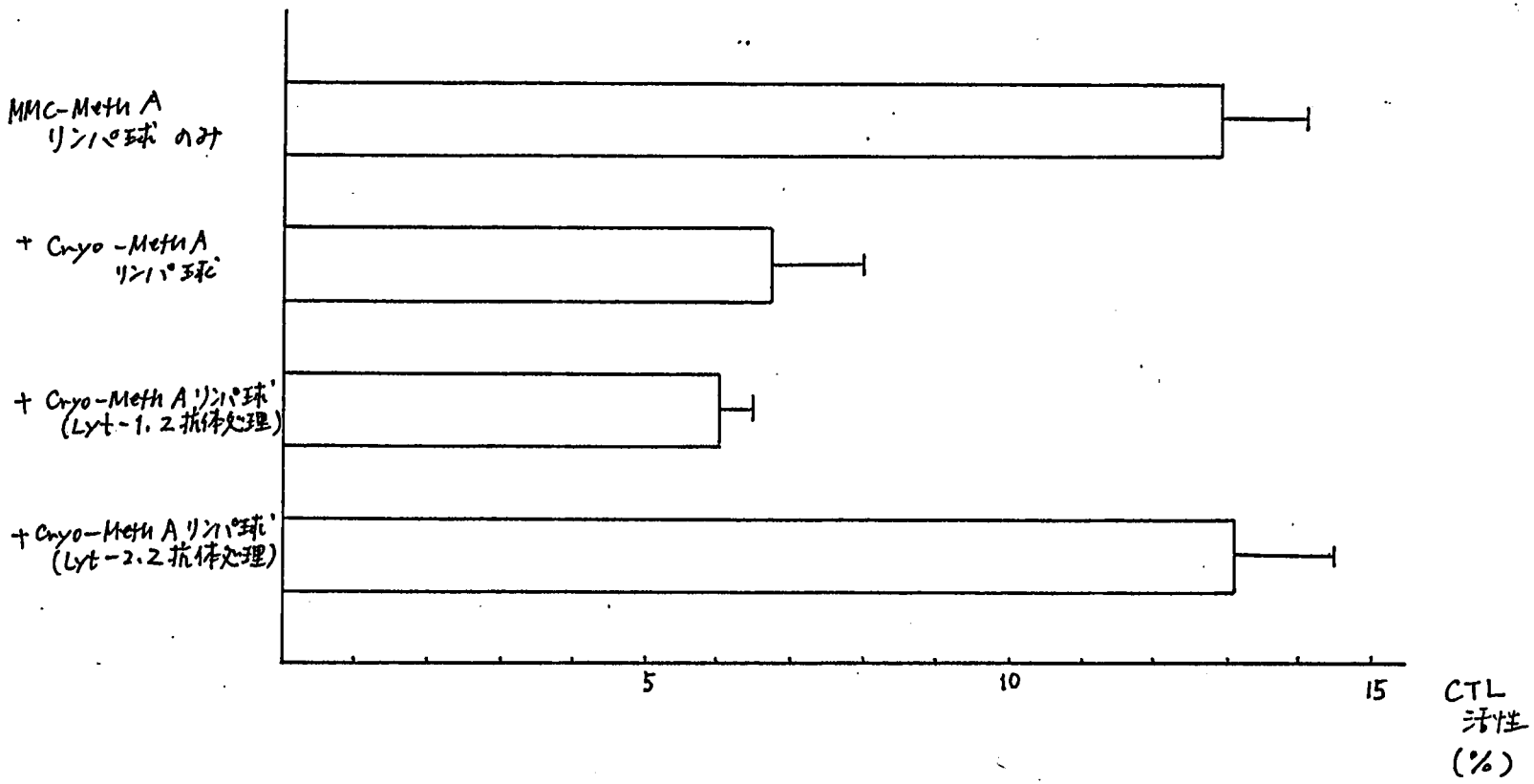
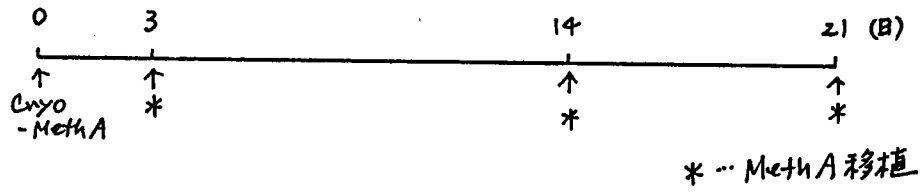

MMC-Meth A
リンパ球のみ
+ Cryo-Meth A
リンパ球
+ Cryo-Meth A リンパ球
(Lyt-1.2 抗体処理)
+ Cryo-Meth A リンパ球
(Lyt-2.2 抗体処理)
5
10
15
CTL
活性
(%)

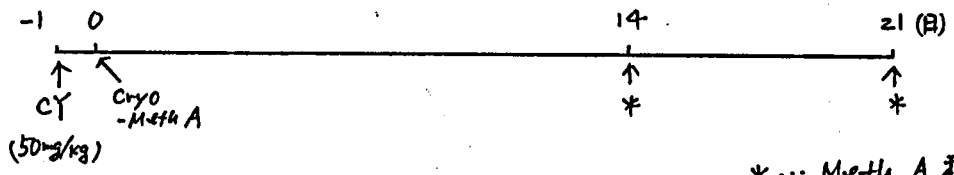
図 21

Cryo-Meth A 単独接種の効果



* … Meth A 移植

Cryo-Meth A と cyclophosphamide の併用効果



* … Meth A 移植

図 22

凍結腫瘍細胞とCyclophosphamideの延命効果

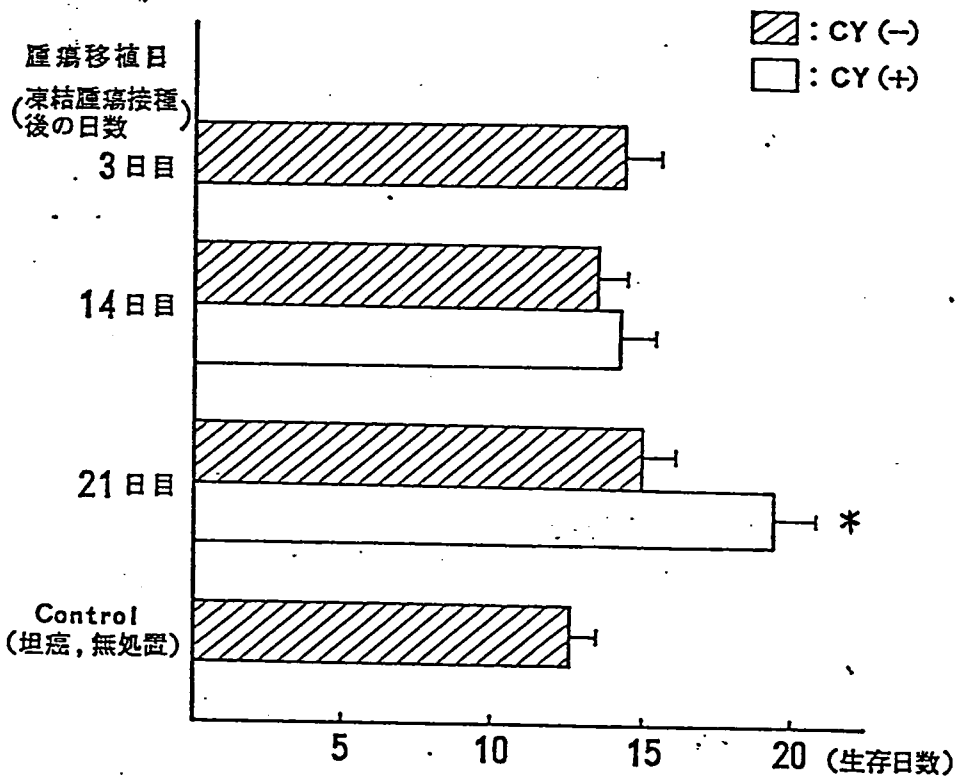


図 23

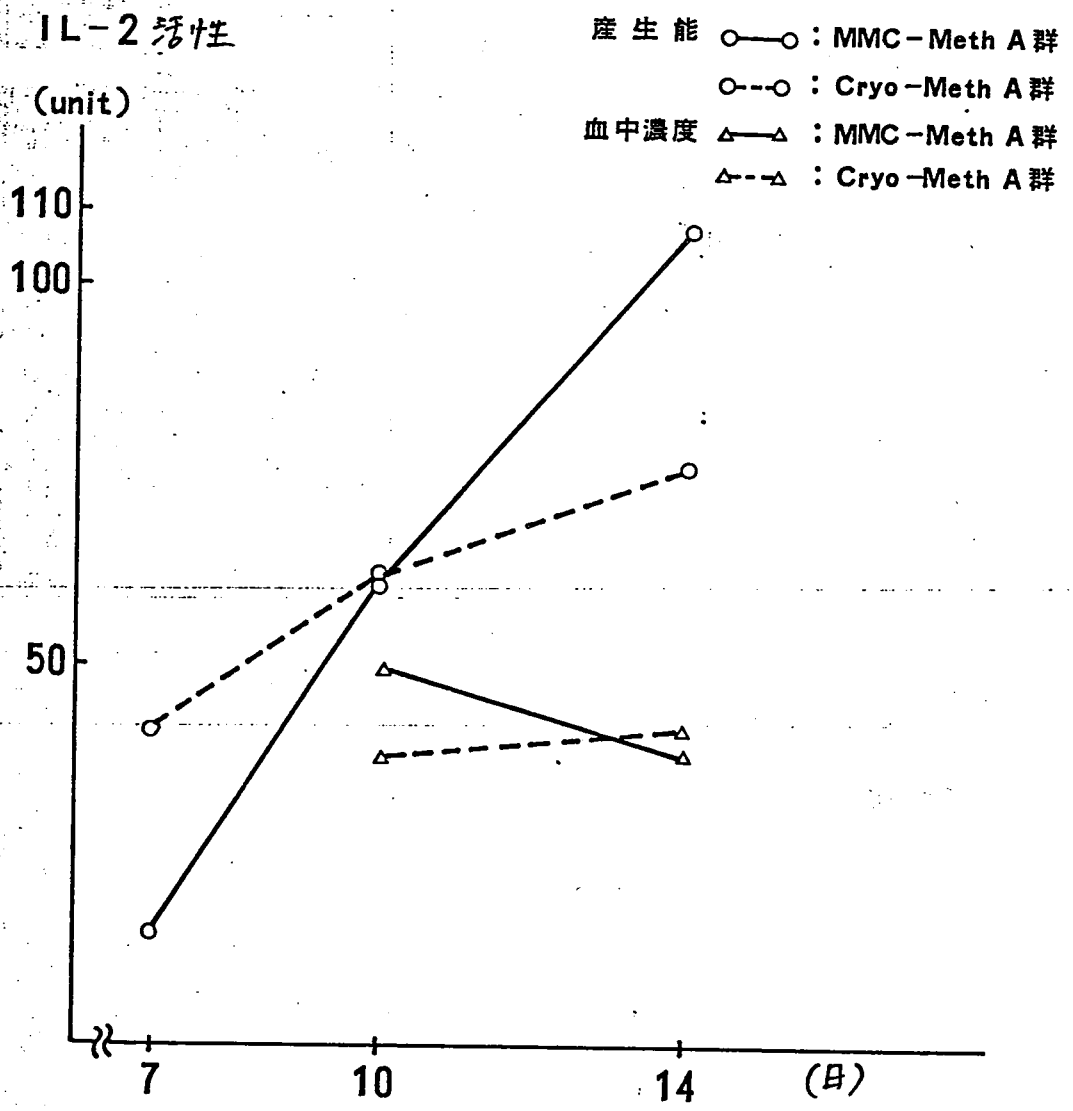

IL-2活性
(unit)
110
100
50
7
10
14
(日)
産生能 ○—○ : MMC-Meth A群
○--○ : Cryo-Meth A群
血中濃度 △—△ : MMC-Meth A群
△--△ : Cryo-Meth A群

図 24

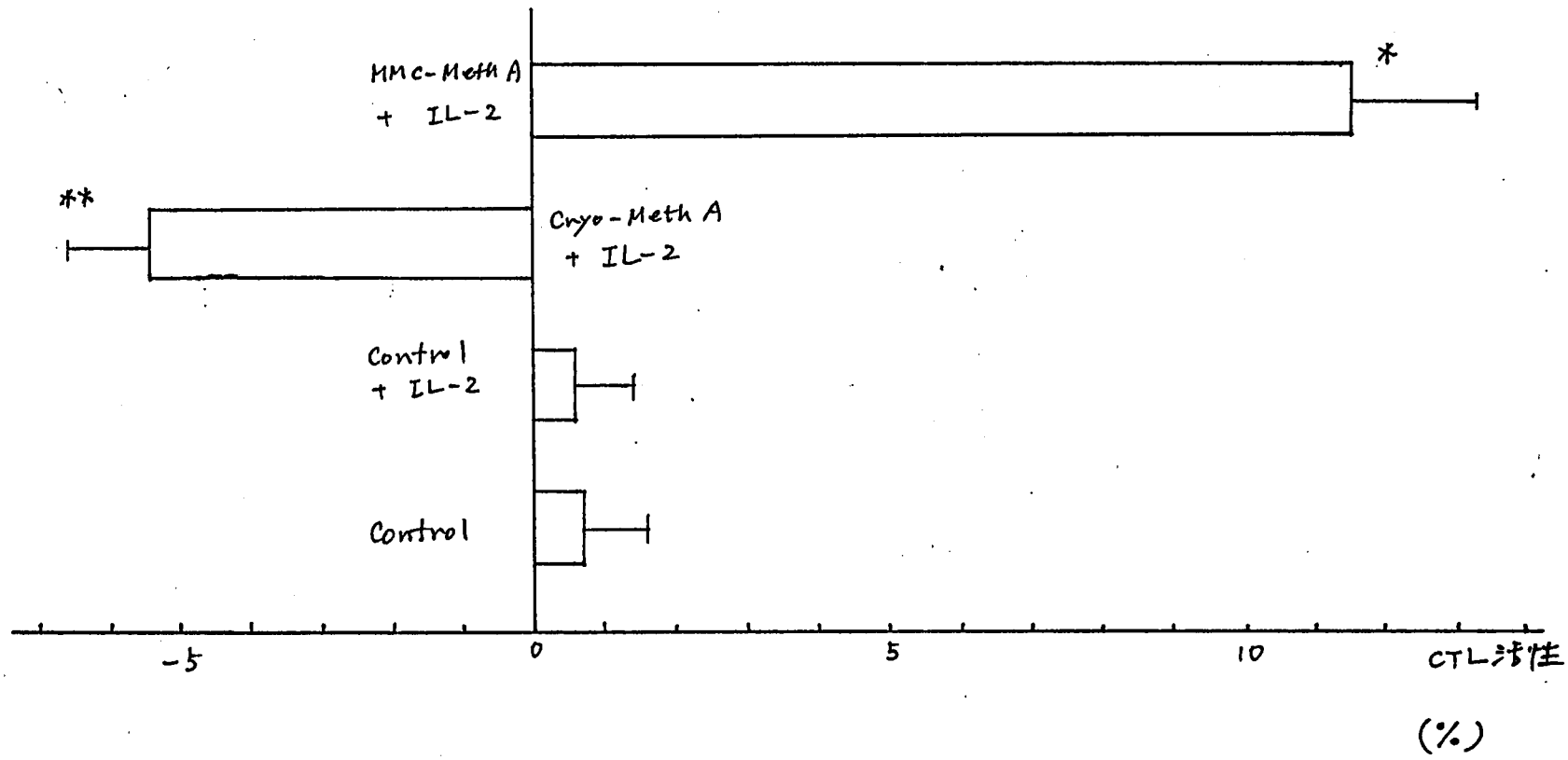

MMC-Meth A
+ IL-2
*
**
Cryo-Meth A
+ IL-2
Control
+ IL-2
Control
-5
0
5
10
CTL活性
(%)

図 25

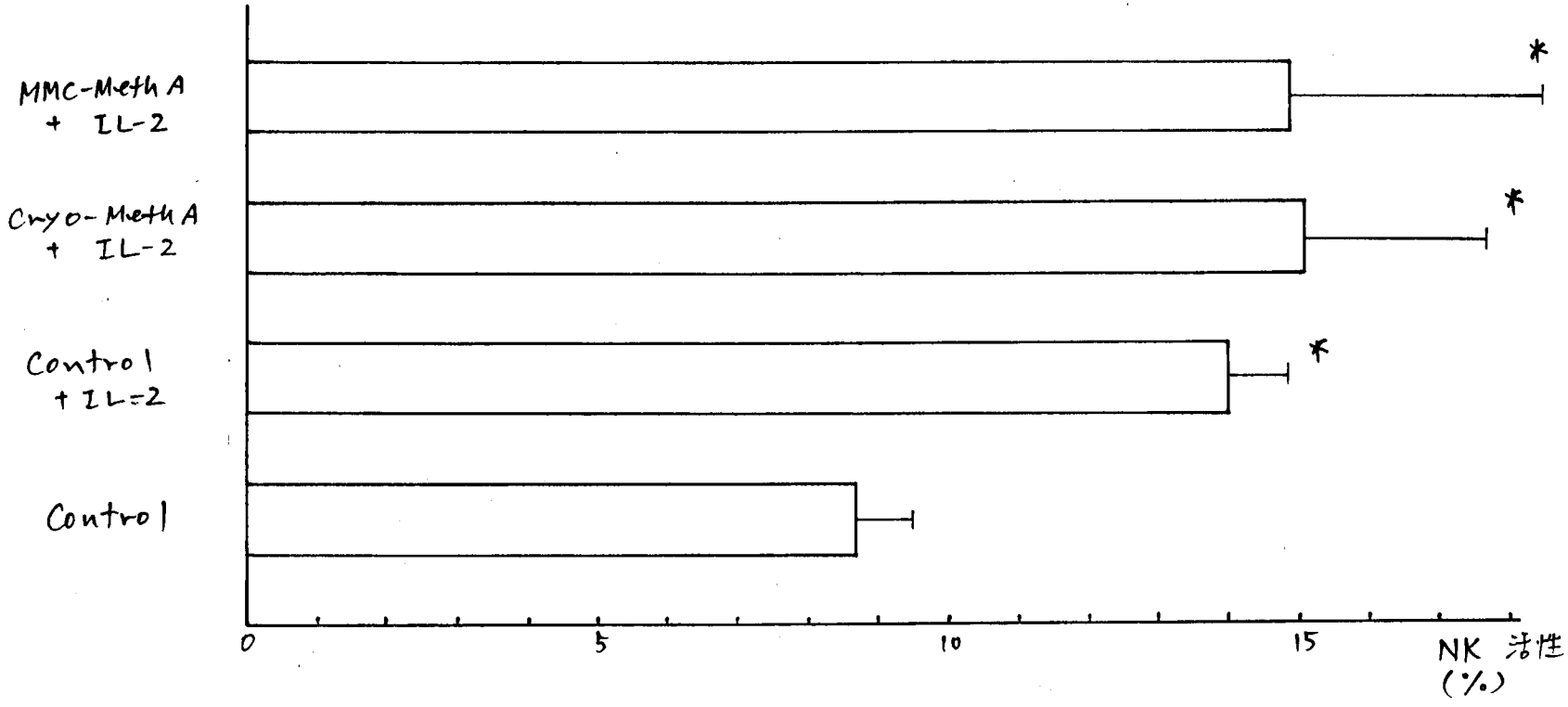

MMC-Meth A
+ IL-2
Cryo-Meth A
+ IL-2
Control
+ IL-2
Control
*
*
*
0
5
10
15
NK 活性
(%)

図 26

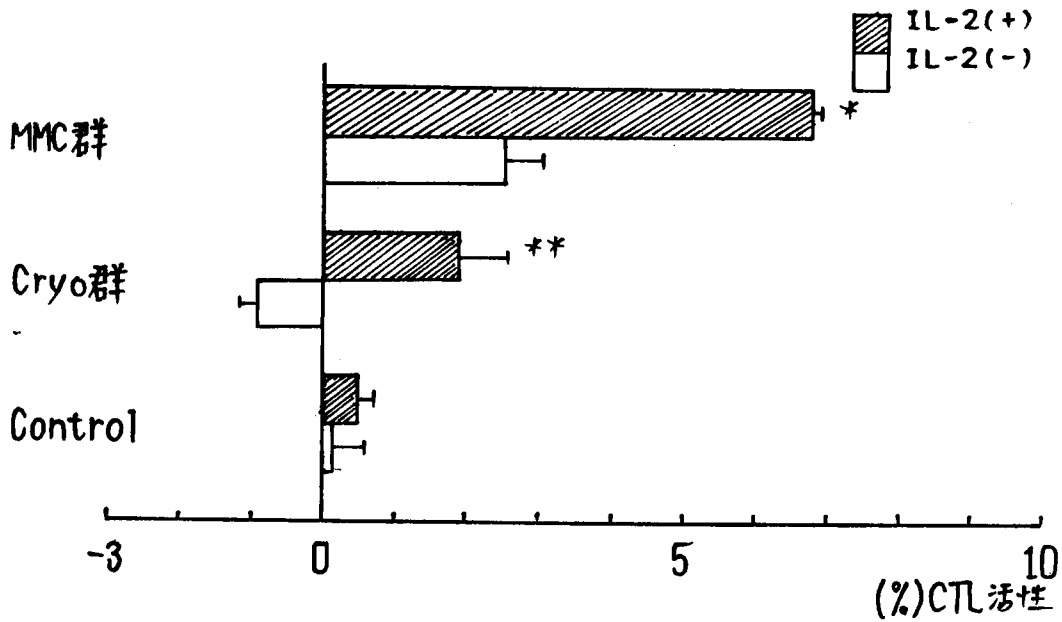


図 27

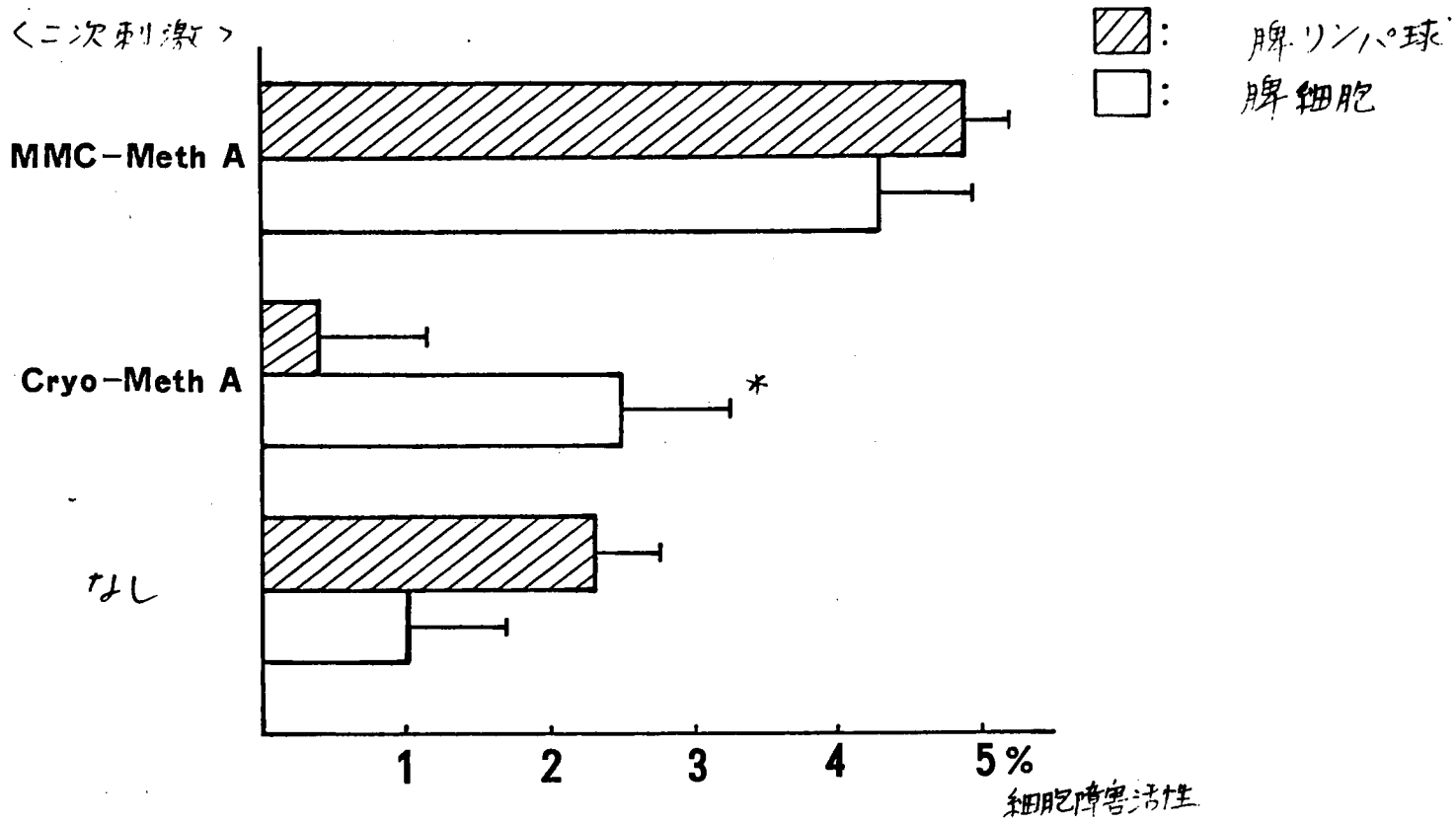


図 28 -(1)

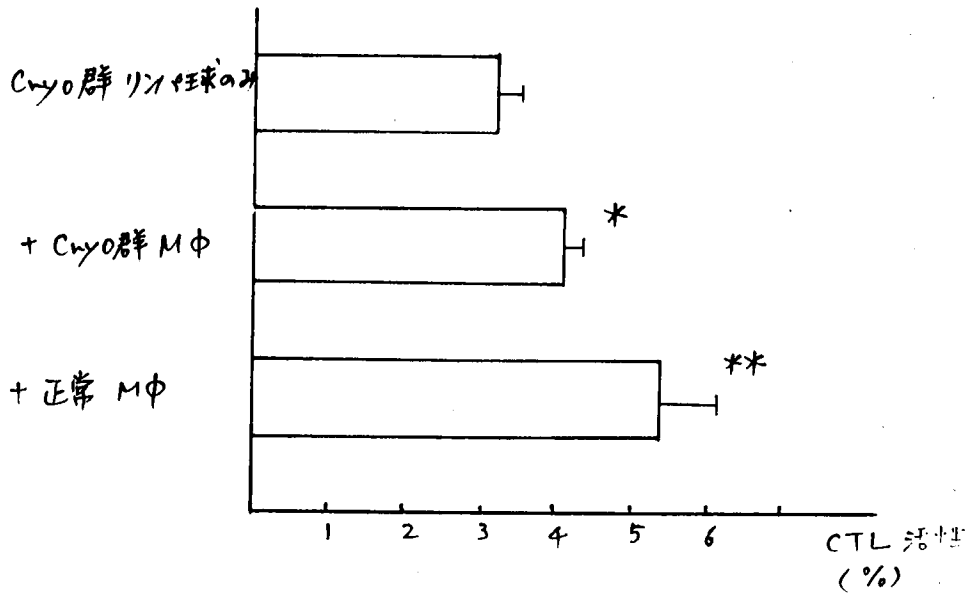


図 28 − (2)

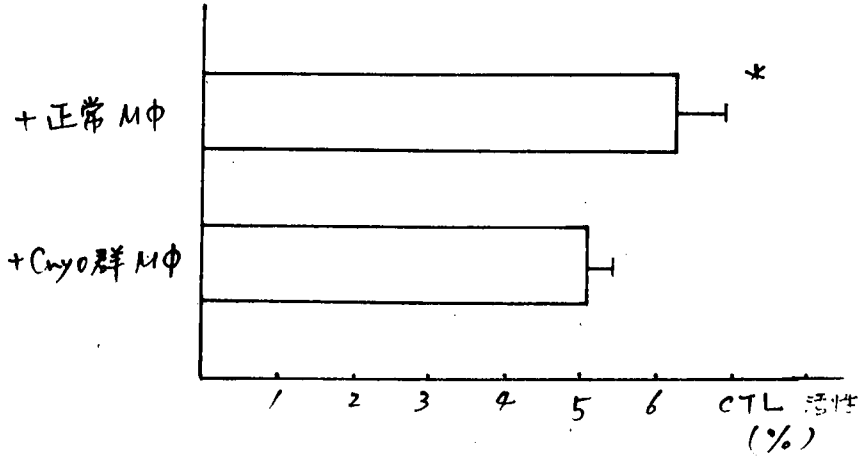


図 29-(1)

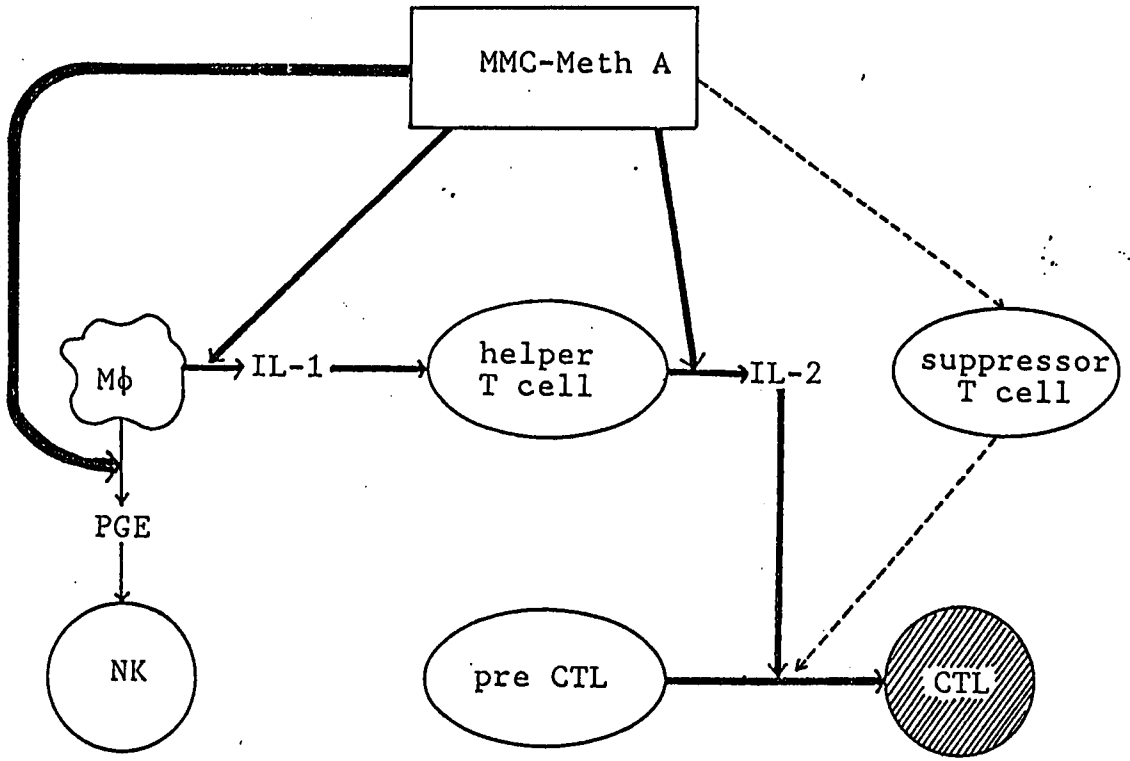

MMC-Meth A
Mϕ
IL-1
helper
T cell
IL-2
suppressor
T cell
PGE
NK
pre CTL
CTL

図 29-(2)

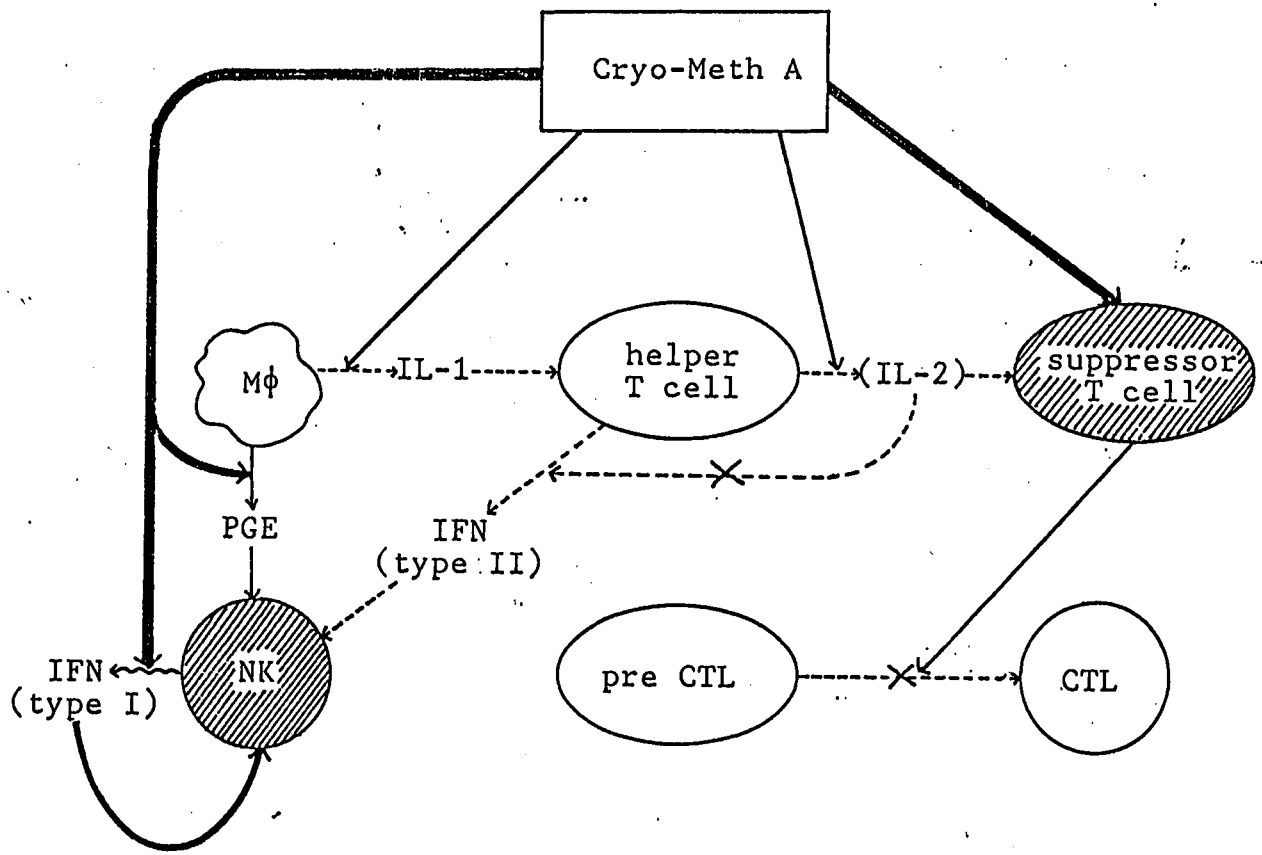

Cryo-Meth A
Mϕ
IL-1
helper
T cell
(IL-2)
suppressor
T cell
PGE
IFN
(type II)
IFN
(type I)
NK
pre CTL
CTL

表 1

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

グループ	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.)