

ラット脳腫瘍モデルを用いた各種 effector 細胞の 脳腫瘍内局所投与における局所免疫応答の検討

川原 孝久

札幌医科大学脳神経外科 (主任 端 和夫 教授)

Analysis of Local Immunoresponses in Local Application of Various Effector Cells in a Rat Brain Tumor Model

Takahisa KAWAHARA

Department of Neurosurgery, Sapporo Medical College.

(chief : Prof. K. HASHI)

ABSTRACT Adoptive immunotherapy with lymphokine activated killer (LAK) cells and interleukin-2 (IL-2) has been shown to be an effective approach to treat cancer patients and for established tumors in animal models. However, the precise nature of local immune response induced by LAK cells at the brain tumor site remains to be determined. The purpose of this study was to ; (1) evaluate the antitumor effects of LAK cells on experimental brain tumors and analyze local immune response at the tumor site, and (2) determine if different effector cells caused different immune reactions at the tumor site.

Inbred 7-week old F344 rats were inoculated with 1×10^4 syngeneic gliosarcoma (T9) cells into the right basal ganglia. Ten days after inoculation, different immune effector cells (normal spleen cells, immune spleen cells, tumor infiltrating lymphocytes (TIL), and LAK cells) were administered intratumorally using a Hamilton microsyringe apparatus. Normal spleen cells and immune spleen cells were found to be cytotoxic against only natural killer (NK)-sensitive target cells, whereas TIL showed cytotoxicity against only T9 cells in terms of ^{51}Cr release assay. LAK cells showed strong cytotoxicity against NK-sensitive, NK-resistant, and T9 cells. Immunohistological analysis revealed a more intense accumulation of CD8-positive cells at the tumor site after injection of LAK cells than that of TIL, immune spleen cells, or normal spleen cells. The therapeutic effects of LAK cells on this brain tumor model was also statistically observed.

These results suggested that LAK cells not only kill T9 tumors directly but also induce local immune response at the brain tumor site. (Received December 27, 1989 and accepted January 25, 1990)

Abbreviations :

CGF : cytotoxic cell generating factor
CSF : colony-stimulating factor
Con A : concanavalin A
CTL : cytotoxic T lymphocyte
DAB : 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
E/T : effector/target
FCS : fetal calf serum
FACS : fluorescein activated cell sorter
FITC : fluorescein isothiocyanate

IL-2 : interleukin-2
LAK : lymphokine activated killer
MLTC : mixed lymphocyte tumor cell culture
MoAb : monoclonal antibody
M ϕ : macrophage
NK : natural killer
PBS : phosphate-buffered saline
PHA : phytohemagglutinin
PPD : purified protein derivative
TIL : tumor infiltrating lymphocytes

Key words: Immunotherapy, Interleukin-2 (IL-2), Lymphokine activated killer (LAK) cells, Rat brain tumor, Tumor infiltrating lymphocytes (TIL)

1 緒 言

脳はその免疫機構に関して他臓器と比べて特殊な臓器であり、“immunologically privileged site”¹⁾であるといわれてきた。しかし脳腫瘍患者には細胞性免疫能の低下、あるいは腫瘍内に著しいリンパ球浸潤をみる例があり、それが病期や予後と相関すること²⁾が報告され、脳においても各種免疫応答の存在が示唆されてきた。

悪性脳腫瘍患者では一般に、PPD 皮内反応の陰性化、PHA 幼若化反応の低下、末梢血 T リンパ球の OKT4/OKT8 比の低下など免疫能の低下が観察されている³⁾。そこで低下した宿主の免疫能を高めるため OK-432、インターフェロンなどの biological response modifier (BRM) の投与による非特異的免疫療法が行なわれているがその効果は十分ではない⁴⁾。一方腫瘍細胞に直接働く特異的免疫療法として、killer T 細胞⁵⁾や Mφ⁶⁾を用いた養子免疫療法 (adoptive immunotherapy) が試みられている。Rosenberg *et al.*^{7,8)} は interleukin-2 (IL-2) によって活性化され、自己腫瘍細胞障害能を有する lymphokine activated killer (LAK) 細胞を用いた adoptive immunotherapy を提唱した。この LAK 細胞による adoptive immunotherapy は、natural killer (NK) 細胞抵抗性の腫瘍細胞にも殺細胞能をもつ等の点で注目をあび、一部の癌症例、また動物実験よりその効果が認められている⁹⁾。

しかし、LAK 細胞は経静脈的に全身投与した場合、腫瘍局所への集積性が低く、また LAK 細胞維持のために投与される大量の IL-2 も vascular leak syndrome、肝機能障害などの副作用を起こすことが問題となっている¹⁰⁾。

養子免疫療法の対象として、脳腫瘍は中枢神経系以外へは転移しにくいこと、比較的局所投与が容易であること等から有効な抗腫瘍 effector 細胞が得られればその局所投与により効果が期待できる腫瘍である。しかし、脳腫瘍内に局所投与された LAK 細胞の抗腫瘍効果、ならびに投与後の局所免疫応答についての解析は十分には行われていない。本研究ではこれらについてラット脳腫瘍モデルによる解析を試みた。

2 実験方法

2.1 実験動物

実験には生後 7 週 of Fisher 系雄ラット (体重 165-175 g, 日本チャールズ・リバー) を使用し、標準飼料 (オリエンタル酵母) と水を自由に与えた。

2.2 腫瘍培養株

名古屋大学脳神経外科吉田博士より供給された N-nitrosourea 誘発 Fisher ラット由来 gliosarcoma (T9) 細胞¹¹⁾ を 6% FCS 加 RPMI 1640 にて 250 ml フラスコ (Falcon 3024, Becton-Dickinson, U. S. A.) 中で単層培養して使用した。使用に際しては壁密着性の T9 細胞を 0.02% Trypsin (Sigma Chemical, U. S. A.) で 10 分間処理した後に、phosphate-buffered saline (PBS) で 3 回洗浄し、6% FCS 加 RPMI 1640 培養液で 4 時間、37°C、5% CO₂ 培養器 (以下、培養器) で培養後、0.2% Trypan-blue で生細胞数を確認して使用した。

2.3 腫瘍の脳内移植法

Fisher ラットに 5% ネプタール注射液[®] を 50 mg/kg 腹腔内投与し麻酔した後、東大式脳固定装置によりラット頭蓋を固定し、歯科用ドリルにて右頭頂部の頭蓋骨に直径約 1 mm の骨窓を開けた。T9 細胞浮遊液は PBS 中に 2×10⁶/ml に調製し、その 5 μl (1×10⁴ 個) を Hamilton CR-700 constant rate microsyringe を用いて骨窓よりラットの右視床に注入した。

2.4 腫瘍増殖曲線

脳内での腫瘍増殖について検討するため、それぞれ 3 匹の腫瘍ラットを移植 1, 5, 10, 15, 20 日後に断頭し、脳組織を 10% ホルマリン緩衝液で固定し連続ヘマトキシリン-エオジン染色標本を作製した。光学顕微鏡下に各標本の腫瘍の長径と短径を測定しこれらの平均を求めた。脳腫瘍塊を球体と考えてこの平均半径より近似的に腫瘍体積を計算し、腫瘍移植後日数と腫瘍体積との相関を直線回帰により、その回帰式と相関係数から求めた。

2.5 試薬と抗体

Interleukin-2 (IL-2) は武田薬品工業より供与された TGP-3 を使用した。

抗ラット単クローン抗体 (MoAb) として、R1-3B3, R1-10B5¹²⁾, R2-1A6¹³⁾ および W3/25 (Sera Lab., U. S. A.)¹⁴⁾ を用いた。R1-3B3 はラット T 細胞マーカーであり、また R2-1A6 はラット Mφ と一部顆粒球の抗原を認識する。R1-10B5 はラット killer/suppressor T 細胞に対する MoAb として、W3/25 は helper/inducer

T細胞を認識するMoAbとして用いた。ラットNK細胞に対する抗体としてはanti asialo GM₁ (生化学工業)¹⁵⁾を用いた。各抗体は抗マウスIgのラットIgに対する交叉反応を防ぐため正常ラット血清で吸収してから用いた。

その他、FITC conjugated rabbit anti-mouse Ig (Meloy Lab., U. S. A.), biotinylated goat anti-mouse Ig (Vector Lab., U. S. A.) を免疫染色の2次抗体として使用した。

2・6 腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) ならびに免疫ラット脾細胞の調整

Ibayashi *et al.*¹⁶⁾の方法にしたがい腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) を採取するため免疫ラットを作製した。免疫を獲得したラット背部に 1×10^7 個のT9細胞を再度皮下注射し、5～6日目に腫瘍塊を無菌的に摘出した。腫瘍塊を微細片化し10%FCS加RPMI 1640培養液(以下、培養液)に浮遊させ培養器で4時間培養し、シャーレに密着性であるT9細胞を除いた後、さらにFicoll-Conray法¹⁷⁾(比重1.096)により生細胞のみを分離しTILとした。また、同様に免疫を獲得したラットの脾細胞をFicoll-Conray法により分離し、免疫ラット脾細胞とした。

2・7 LAK細胞の誘導

同系ラット脾細胞をFicoll-Conray法を用いた比重遠心法(250 G, 20 min.)にてmononuclear cellsを分離した後、培養液中に $1 \times 10^7/ml$ の細胞濃度で浮遊させ、プラスチックシャーレ(Falcon 3003, Becton-Dickinson, U. S. A.)中に45分間培養して付着細胞を除去した¹⁸⁾。その後、250 ml フラスコ(Falcon 3024, Becton-Dickinson, U. S. A.)中で培養液に $2 \times 10^6/ml$ の細胞濃度で浮遊させ、IL-2 10 U/mlの存在下、培養器で3日間培養したものをLAK細胞として用いた。

2・8 FACS analyzerによるeffector細胞の解析

各effector細胞 1×10^6 個をpelletにし、至適濃度のR1-3B3, R1-10B5, R2-1A6, W3/25をそれぞれ30 μ lずつ加え4℃で45分間反応させた。PBSで2回洗浄した後、FITC conjugated rabbit anti-mouse Ig (Meloy Lab., U. S. A.)を30 μ lずつ加え4℃で30分間反応させた。PBSで2回洗浄した後、0.1%パラホルムアルデヒドにて固定し、FACS analyzer (Becton-Dickinson, U. S. A.)により解析した。

2・9 In vitro 細胞障害試験

Standard ⁵¹Cr release assay¹⁹⁾により、ヒトerythroleukemia細胞株であるNK-sensitive target K562, ヒトのパーキットリンパ腫細胞株であるNK-resistant

target Daudi, ならびにT9細胞に対するeffector細胞のkiller活性を調べた。 1×10^7 個のK562, Daudi, T9細胞を各1 mlの培養液に浮遊させ、100 μ Ciの⁵¹Cr sodium chromate (アマシャム・ジャパン)を加え、培養器で90分間反応させた。ラベル後数回PBSで洗浄した後に培養液で $1 \times 10^6/ml$ の濃度に再浮遊させた。100 μ lのtarget細胞と100 μ lのeffector細胞をE/T比が各々40:1～5:1となるように3wellを1組(triplicate)として96well V型底プレートに入れ、600 rpm 5分間の遠心後、培養器で4時間培養した。培養後2,000 rpm 10分間遠心し、その上清100 μ lずつをLKB multigamma 1260 counterで測定した。対照としてeffector細胞の代わりに培養液を100 μ l加えたものをspontaneous releaseとし、5% Nonidet P-40 (BDH Chemicals, U. S. A.)溶液を加えたものをmaximum releaseとした。なお、%specific lysisは以下の式で求めた。

%specific lysis =

$$\frac{(\text{mean experimental cpm} - \text{mean spontaneous cpm})}{(\text{mean maximum cpm} - \text{mean spontaneous cpm})} \times 100$$

2・10 Effector細胞の腫瘍内局所投与

正常ラット脾細胞、免疫ラット脾細胞、TILならびにLAK細胞を、T9細胞移植の10日後に腫瘍内に局所投与した。細胞は、PBSにより十分洗浄し0.2% trypan-blueにて生細胞数を確認した後、5 μ lのPBS中に投与細胞数が含まれるように調製し、これをHamilton microsyringeを用いて、腫瘍移植時の骨窓より脳腫瘍内に注入した。

2・11 脳腫瘍組織の免疫組織学的検索

各種effector細胞を脳腫瘍内局所投与した1日後と3日後に、腫瘍組織を取り出し、凍結切片を作製し、各MoAbを用いてAvidin Biotin Complex法(ABC法)²⁰⁾により免疫染色した。DAB反応基質液の中で発色させ、ヘマトキシリン溶液で核染色した後、脱水封入し観察に供した。観察結果をリンパ球浸潤の程度により、浸潤が非常に強い(++), 中等度(+), 弱い(±), 浸潤をみとめない(-)の4段階に分けて評価した。

2・12 ラット体重増加曲線と%体重

各群6匹のラットにT9細胞 1×10^4 個を脳内移植した後、体重を連日1 g単位で測定し、体重増加曲線を作成した。対照群としてPBSのみを5 μ l脳内に注入したラットを12匹作製した。測定日の対照群の平均体重に対する実験群の平均体重の割合から%体重を算出し、腫瘍移植後の%体重の変化を観察した。その結果から

各 effector 細胞投与による体重減少の抑制効果を各群 6 匹以上のラットを用いて検討した。

2・13 Concanavalin A (Con A) stimulation および MLTC

腫瘍の発育部位の相違による生体免疫反応の違いを検討する目的で、脳内ならびに皮下に T9 細胞 1×10^4 個を移植し、0, 3, 7, 10, 15 日後にこれら担癌ラットの脾細胞より mononuclear cells を分離し、培養液中に $4 \times 10^6/ml$ で浮遊させ、triplicate に各々 $100 \mu l$ に対し $100 \mu l$ の $10 \mu g/ml$ concanavalin A (Con A) (Sigma Chemical, U. S. A.) 溶液を加えた。対照には培養液を $100 \mu l$ 加えた。培養器で 44 時間培養した後、methyl- 3H -thymidine (アマシャム・ジャパン) を $1 \mu Ci/well$ ずつ加え、4 時間の取り込みを液体シンチレーションカウンター (Beckman LSC 5801, Beckman Instruments, U. S. A.) で測定した。

また、 $5 \times 10^6/ml$ の T9 細胞浮遊液に mitomycin C (MMC) (協和発酵) を $50 \mu g/ml$ 加えて 45 分間培養し、3 回洗浄した後、Responder: Stimulator=8:

1~2:1 となるように T9 細胞浮遊液 $100 \mu l$ を triplicate で mononuclear cells 浮遊液各 $100 \mu l$ に加え、これを 4 日間培養した後、同様に methyl- 3H -thymidine を加え 24 時間の取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。対照には T9 細胞浮遊液の代わりに培養液を $100 \mu l$ 加えた。

2・14 統計学的処理

統計学的処理のため各群 6 匹以上のラットを使用して実験を行なった。非治療例の腫瘍増殖曲線ならびに%体重曲線の作成には 12 匹以上のラットを使用した。また、体重減少抑制による in vivo の抗腫瘍効果の判定の際には、経時的連続性をもった反復データの分析法として共分散分析法²¹⁾を用いて有意差の検定を行なった。

3 結 果

3・1 脳内移植腫瘍の組織像と成長曲線

脳内に移植した 1×10^4 個の T9 細胞は 100% 生着し、移植後日数とともに腫瘍は増大しラットは約 21 日後に腫瘍死した。この系では腫瘍の自然消退はみられなかつ

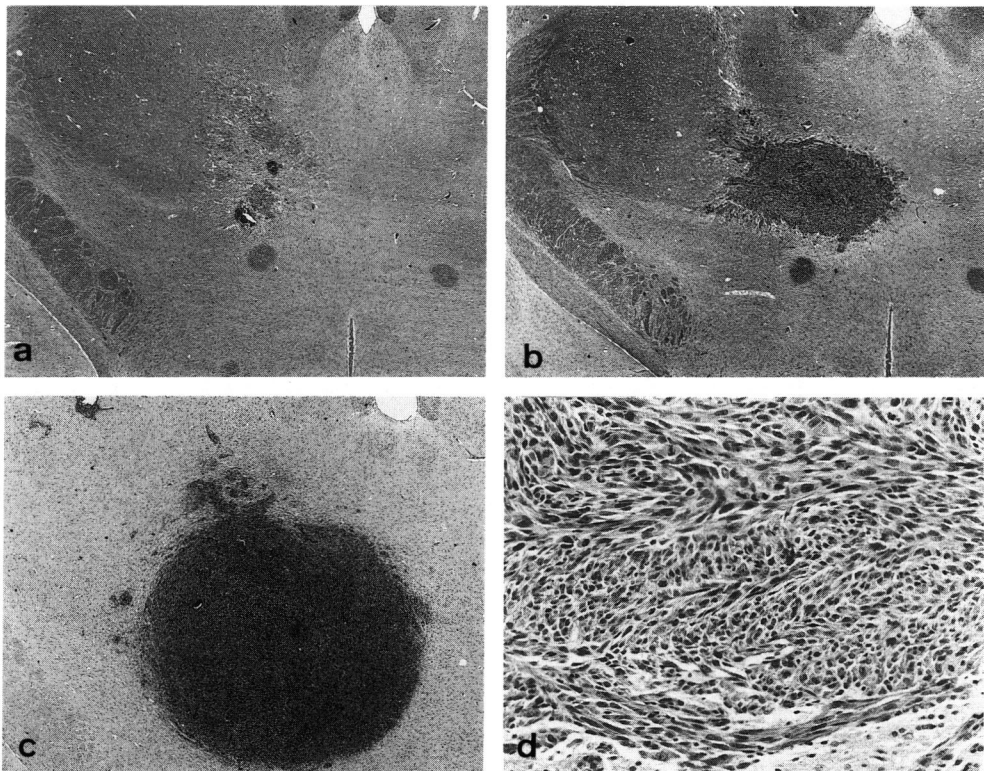


Fig. 1 Intracranial growth of T9 cells. Inbred 7-wk-old F344 rats (body weight about 170 g) were inoculated with 1×10^4 T9 cells into the right basal ganglia. Tumor tissues were prepared and stained with Hematoxylin-Eosin at day 5 (a), day 10 (b), and day 15 (c) ($\times 17$). Tumor cells with large and mitotic nuclei and sarcomatous component were seen (d) ($\times 170$).

た。Fig. 1 にラットの右視床内に生着した T9 腫瘍が経時的に増大している像を示した(Fig. 1a, b, c)。T9 細胞は大型で異型性の強い核を持ち、流紋状の細胞配列を示し(Fig. 1d)、腫瘍内および腫瘍周囲にはリンパ球と思われるクロマチンが強く染まる小型の細胞が少数認められた。

計測した腫瘍体積(Y)の対数と、腫瘍移植後の日数(X)の間には $[\log Y = -0.41 + 8.54 \times 10^{-2} X, R =$

0.98]とほぼ直線的な相関があった(Fig. 2a)。また、%体重は腫瘍移植1週間後より徐々に減少し、腫瘍移植後2週以降には急激に減少した。この時の%体重(Y)と腫瘍体積(X)との相関を求めたところ $[Y = 95.1 - 0.83 X, R = 0.89]$ と直線的関係が認められ(Fig. 2b)、腫瘍体積と%体重とのあいだには強い負の相関を認めた。

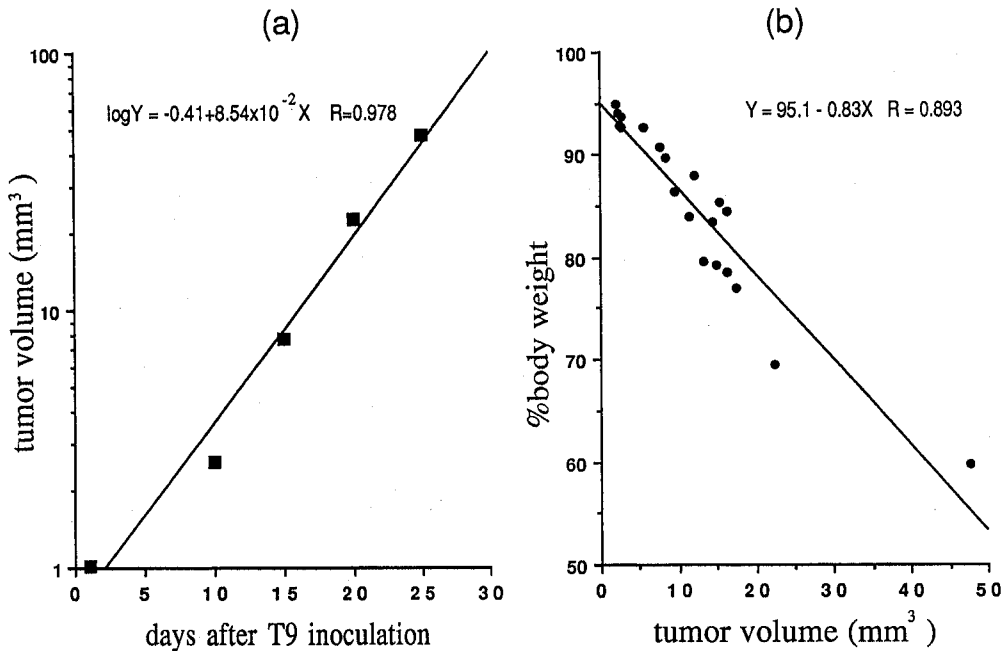


Fig. 2 (a) Intracranial tumor volume of T9 cells plotted against days after the inoculation performed with the condition described in the legend of Fig. 1. The mean size of three inoculated tumors was measured every 5 days.

(b) Correlation between the tumor volume and %body weight gain calculated as a ratio of body weight gain in the tumor bearing and normal rats. There is a negative linear correlation between these two variables.

Table 1 Phenotypic analysis of normal and immune spleen cells, TIL, and LAK cells

	% of cells reactive with MoAb			
	3B3 ^{a)}	10B5	1A6	W3/25
NSP ^{c)}	53.9 ± 8.3 ^{b)}	30.2 ± 7.2	19.4 ± 7.6	32.7 ± 8.1
ISP	44.3 ± 7.9	32.1 ± 6.9	15.4 ± 7.0	30.2 ± 6.8
TIL	78.0 ± 9.1	41.0 ± 8.7	3.9 ± 2.8	4.6 ± 3.8
LAK	63.1 ± 7.1	52.8 ± 5.6	6.1 ± 4.8	29.0 ± 7.4

^{a)} Mononuclear cells were stained by immunofluorescence with R1-3B3, R1-10B5, R2-1A6, and W3/25.

^{b)} Values are expressed as mean ± SEM of three separate experiments.

^{c)} NSP: normal spleen cells, ISP: immune spleen cells, TIL: tumor infiltrating lymphocytes, LAK: lymphokine activated killer cells.

3・2 Effector 細胞の FACS analyzer による解析

Table 1 に各 effector 細胞の FACS analyzer による解析の結果を示す。正常ラット脾細胞より分離した細胞では 53.9% が R1-3B3 陽性細胞であり, R1-10B5 陽性細胞は 30.2%, R2-1A6 陽性細胞は 19.4%, W3/25 陽性細胞は 32.7% であった。免疫ラットの脾細胞では, それぞれ 44.3%, 32.1%, 15.4%, 30.2% で正常ラットとほぼ同様の分布を示した。

腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) ではそれぞれ 78.0%, 41.0%, 3.9%, 4.6% と T 細胞の増加とともに, 特に killer/suppressor T 細胞の割合が著しく増加しており, Mφ, helper/inducer T 細胞の割合は著明に減少していた。これに対し LAK 細胞では T 細胞が 63.1%, killer/suppressor T 細胞が 52.8% と増加していた。Helper/inducer T 細胞は 29.0% と正常ラット脾細胞と同程度であった。

3・3 *In vitro*での T9 細胞に対するキラー活性

Fig. 3 に E/T 比が 40:1 の場合の ^{51}Cr release assay による正常ラット脾細胞, 免疫ラット脾細胞, TIL ならびに LAK 細胞の各 target cell に対する killer 活性を示した。正常ラット脾細胞では K562 に対する killer 活性は 19.3%, Daudi, T9 細胞に対してはそれぞれ 2.8%, 3.7% であった。免疫ラット脾細胞はそれ

ぞれ 27.4%, 6.2%, 7.9% と NK 活性が高い傾向が認められた。TIL ではそれぞれ 2.1%, 1.4%, 26.4% と T9 細胞に対して特異的に高い killer 活性を示した。LAK 細胞はそれぞれ 38.0%, 32.1%, 22.0% と腫瘍に非特異的に高い killer 活性を示した。

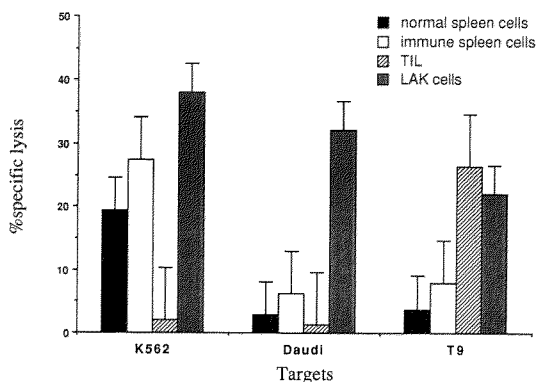


Fig. 3 Cytotoxic activity of normal and immune spleen cells, TIL, and LAK cells against K562, Daudi, and T9 target cells. The values are expressed as the percentage of the specific chromium release \pm SEM of three separate experiments (E/T = 40:1).

Table 2 Phenotypic analysis of tumor infiltrating lymphocytes

	3B3 ^{a)}	10B5	1A6	W3/25	Asialo GM ₁
NSP 1 day aft. ^{c)}	\pm ^{b)}	\pm	+	\pm	+
NSP 3 days aft.	\pm	\pm	++	\pm	+
ISP 1 day aft.	\pm	\pm	+	-	\pm
ISP 3 days aft.	++	++	++	+	+
TIL 1 day aft.	++	++	++	+	+
TIL 3 days aft.	\pm	-	+	\pm	-
LAK 1 day aft.	++	++	+	-	\pm
LAK 3 days aft.	++	++	++	\pm	+

^{a)} Tumor specimens were stained by immunoperoxidase techniques with R1-3B3, R1-10B5, R2-1A6, W3/25, and asialo GM₁.

^{b)} The degree of mononuclear cells's infiltration were expressed as follows.; strongly infiltrated (++), moderately infiltrated (+), rarely infiltrated (\pm), none (-).

^{c)} NSP: normal spleen cells, ISP: immune spleen cells, TIL: tumor infiltrating lymphocytes, LAK: lymphokine activated killer cells.

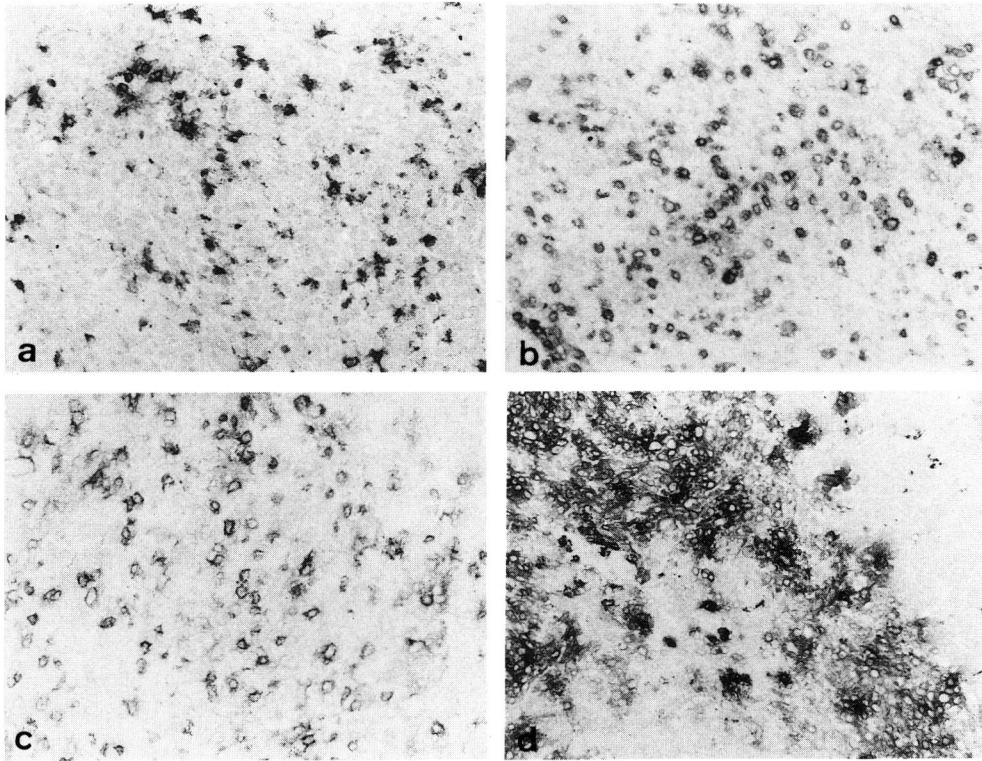


Fig. 4 Immunohistological analysis of tumor tissue treated with normal (a) or immune spleen cells (b, c, d). Mononuclear cells were stained by immunoperoxidase techniques with R2-1A6 (a, d), R1-3B3 (b), and R1-10B5 (c) ($\times 170$).

3・4 腫瘍組織の免疫組織学的解析

Fig. 4, 5, 6 に各 effector 細胞の投与 1 日後, 3 日後の酵素抗体法による組織像を示した. また, 各組織でのリンパ球浸潤の程度を 4 段階に分けて Table 2 にまとめた.

未治療群の脳腫瘍に於てはリンパ球浸潤は(-)~(±)と極く僅かであった. 正常ラット脾細胞投与群では 3B3 陽性細胞, 10B5 陽性細胞の浸潤は(±)で, 1A6 陽性細胞である Mφ の浸潤が 1 日後(+), 3 日後(++)であった (Fig. 4a). Asialo GM₁ 陽性細胞も (+) であった. 免疫ラットの脾細胞投与群では 1 日後には 1A6 陽性細胞は (+) であったが, リンパ球の浸潤は(±)と極く僅かであった. しかし, 3 日後には強いリンパ球浸潤を認め, 特に 3B3 陽性細胞 (Fig. 4b), 10B5 陽性細胞 (Fig. 4c), 1A6 陽性細胞 (Fig. 4d) は (++) であった. また W3/25 陽性細胞も (+) であった. TIL 投与群では 1 日後に 3B3 陽性細胞 (Fig. 5a), 10B5 陽性細胞 (Fig. 5b), 1A6 陽性細胞 (Fig. 5c) などが (++) と強い浸潤を認め, また W3/25 陽性細胞の浸潤も (+)

であった (Fig. 5d). しかし, 3 日後ではこれら細胞はほとんど認められなくなった. これらに対し LAK 細胞投与群では 1 日後, 3 日後とも (++) と強いリンパ球浸潤を認めた. 特に 3B3 陽性細胞 (Fig. 6a), 10B5 陽性細胞 (Fig. 6b) の浸潤が他の effector 細胞よりも著明であった. 1A6 陽性細胞も 3 日後に (++) と強い浸潤がみられ (Fig. 6c), asialo GM₁ 陽性細胞も (+) であった (Fig. 6d). W3/25 陽性細胞は 1 日後, 3 日後ともほとんど認められなかった.

3・5 Effector 細胞投与による体重減少の抑制効果

正常ラット脾細胞, 免疫ラット脾細胞, そして LAK 細胞 4×10^6 個を T9 細胞の脳内移植の 10 日後に腫瘍内局所投与し, 治療効果を体重減少抑制効果として評価した. 実験には各群 6 匹のラットを用いた.

本ラット脳腫瘍モデルでは腫瘍移植後約 10 日まで % 体重は正常ラットとほぼ同じであったが, それ以降急激に減少した (Fig. 7).

各 effector 細胞投与群と対照群との間の % 体重の変化の比較では, 脳腫瘍担癌ラットの % 体重が正常ラッ

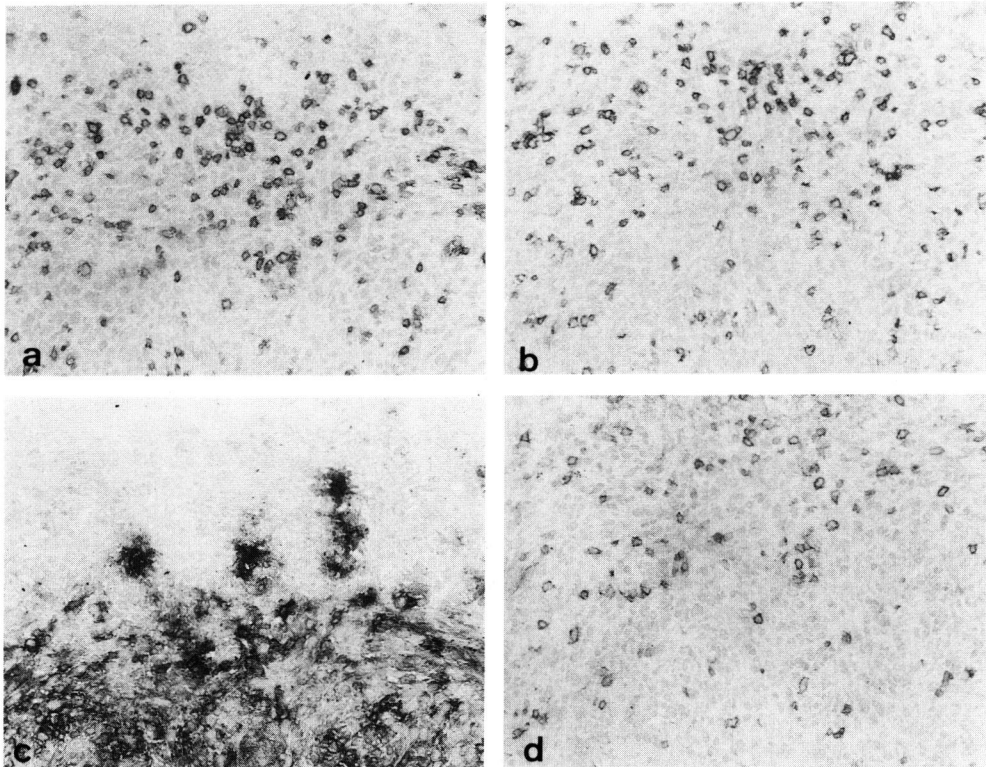


Fig. 5 Immunohistological analysis of tumor tissue treated with TIL. Mononuclear cells were stained by immunoperoxidase techniques with R1-3B3 (a), R1-10B5 (b), R2-1A6 (c), and W3/25 (d). The majority of mononuclear cells were stained with R1-3B3, R1-10B5 and R2-1A6 ($\times 170$).

トの90%となる期間で比較すると、対照群で16日、正常脾細胞で13日、免疫脾細胞で13日、であったがLAK細胞投与群では25日であった。統計学的にはLAK細胞投与群のみに有意な体重減少の抑制が認められた ($p < 0.05$).

LAK細胞の投与細胞数を 5×10^5 個, 1×10^6 個, 4×10^6 個とした群について検討した結果、有意に体重減少の抑制が認められたのはLAK細胞 4×10^6 個投与群のみであった (Fig. 8) ($p < 0.05$).

3.6 担癌宿主の免疫反応

披癌0, 3, 7, 10, 15日目の脾細胞の反応性を脳腫瘍ラット, ならびに皮下腫瘍ラットについて調べた。Con Aに対する反応は脳腫瘍および皮下腫瘍のどちらの担癌状態であっても担癌日数にしたがって増加する傾向が見られ、脳腫瘍ラット脾細胞では担癌10日目でも最も高い反応が見られ対照群の2.7倍の ^3H -thymidineの取り込みがあった (Fig. 9a)。MLTCでも脳腫瘍および皮下腫瘍のどちらの系もほぼ同様な反応を呈し、反応の増加のピークは担癌7日目ですれぞれ対照の8.8倍,

7.3倍で皮下腫瘍ラット脾細胞では担癌15日目において3.1倍の取り込みが認められた (Fig. 9b)。

4 考 察

4.1 本研究に使用したラット脳腫瘍モデルについて

従来の実験脳腫瘍モデルでは多量の腫瘍細胞を移植するために腫瘍死するまでの期間が極端に短く、また単に生存率や生存日数でのみ評価するため経時的な観察には適していなかった²²⁾。そこで新しく脳腫瘍に対する局所療法を正しく評価するために以下のような特徴を持つ脳腫瘍モデルが必要とされた。1) 自然に発生する脳腫瘍に近いこと, 2) 観察が容易でかつ一定期間以上可能であること, 3) 抗腫瘍効果が腫瘍体積との関係で評価できること等である。

1) に関して本研究に用いたモデルは自然発生に近い担癌状態を実現するために syngeneic な腫瘍として T9 gliosarcoma を用い、 1×10^4 個とごく少数を脳内に移植した。免疫組織学的解析の結果では、T9細胞が生着増大している時期にはリンパ球ならびにMφの浸潤は

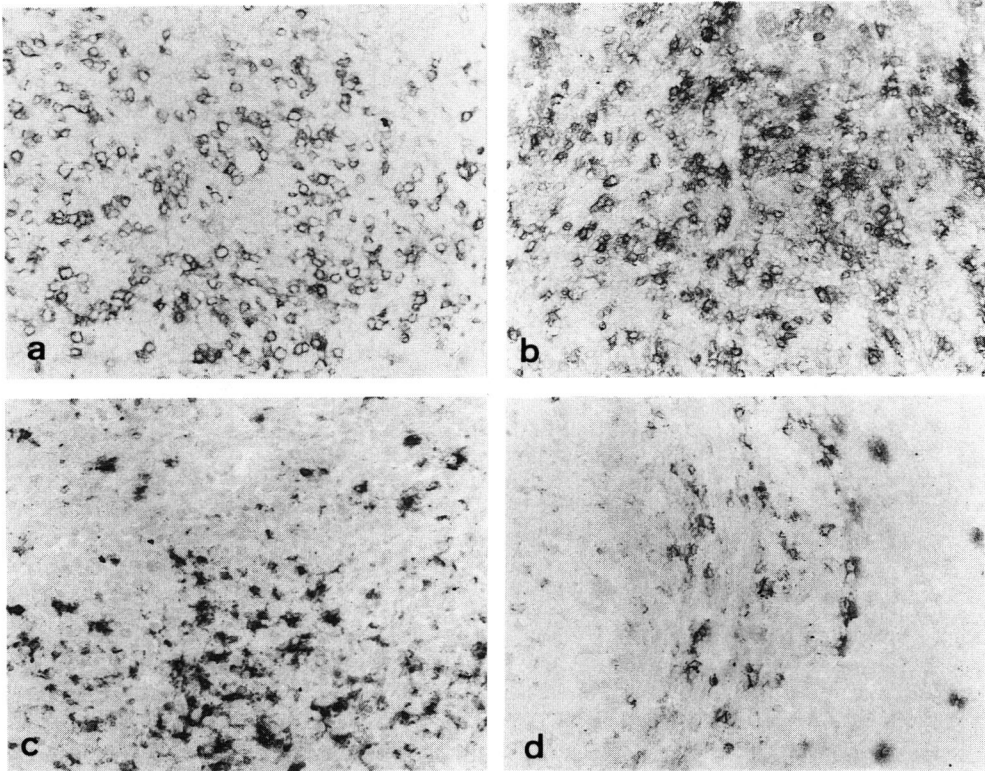


Fig. 6 Immunohistological analysis of tumor tissue treated with LAK cells. Mononuclear cells were stained by immunoperoxidase techniques with R1-3B3 (a), R1-10B5 (b), R2-1A6 (c), and asialo GM₁ (d). The majority of mononuclear cells were stained with R1-3B3 and R1-10B5 ($\times 170$).

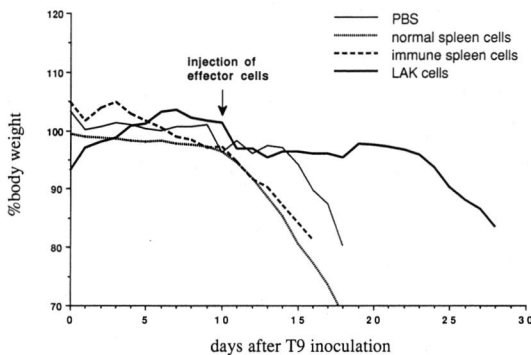


Fig. 7 Effect of intratumoral injection of various effector cells on the tumor growth as reflected by the differences in body weight in the experimental animals. Normal and immune spleen cells, and LAK cells were injected intratumorally to each 6 rats on day 10. Obvious anti-tumor effect of injected LAK cells was observed by delay of the occurrence of body weight loss as shown by the solid line ($p < 0.05$).

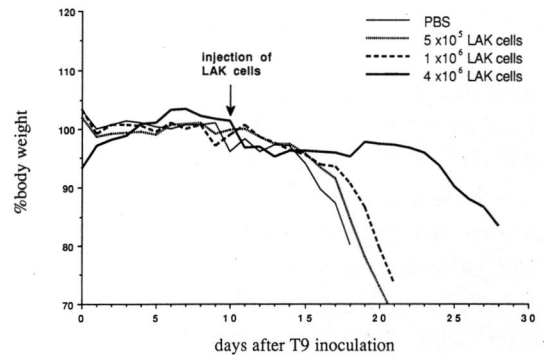


Fig. 8 Effect of doses of injected LAK cells on the tumor growth. Half million, 1.0×10^6 , and 4.0×10^6 LAK cells were injected intratumorally to each 6 rats on day 10. Anti-tumor effect was observed by the injection of 4.0×10^6 LAK cells ($p < 0.05$).

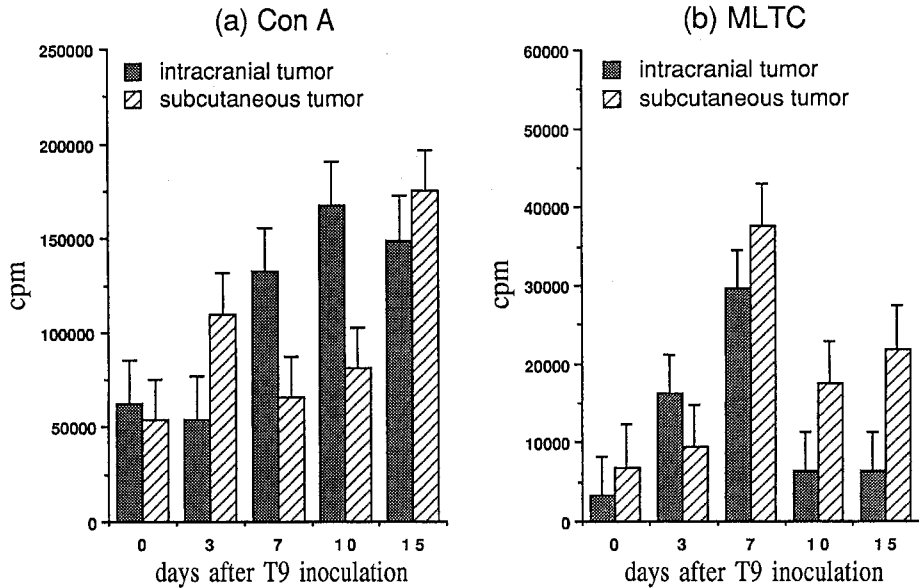


Fig. 9 (a) Proliferative response to Con A of spleen cells with the presence of either intracranial (■) or subcutaneous (▨) T9 cells. The activity of lymphocyte was increased in day 3 to day 15 after T9 inoculation. Values were expressed as mean cpm±SEM of three separate experiments.

(b) Proliferative response observed in MLTC of spleen cells with the presence of either intracranial (■) or subcutaneous (▨) T9 cells. The peak response of lymphocyte proliferation was seen on day 7. Values were expressed as mean cpm±SEM of three separate experiments.

ほとんど認められず (Fig. 1), 局所での反応は小さいものと思われた。ラット皮下腫瘍の拒絶過程においては腫瘍内浸潤リンパ球の程度は、腫瘍抗原性が高いもの程リンパ球浸潤の程度が強いことが報告されている²³⁾ことから、本モデルにおいて腫瘍内浸潤リンパ球がほとんど観察されないのは T9 細胞本来の低抗原性と、移植細胞数が少ないことによる抗原刺激の減少に起因する escape 現象と思われる、この点で実際に自然発生した腫瘍に近いモデルが成立していると考えられた。

2) に関しては C6 astrocytoma, あるいは 9L gliosarcoma で作製された脳腫瘍モデル²²⁾では大量の腫瘍細胞を移植するために生存期間が短かく腫瘍の生着後に effector 細胞を投与しても十分な観察期間が取れない。しかし本モデルでは移植した細胞数が少ないため観察期間も従来の脳腫瘍モデルより延長され、*in vivo*での effector 細胞の効果の検討も腫瘍移植操作などによる影響が少ない時期に可能であった。

3) については *in vivo*における抗腫瘍効果を検討するために腫瘍体積と相関するパラメータが必要であったが、従来の評価では腫瘍体積との相関が出せなかった。本モデルでは腫瘍体積と腫瘍移植後の日数との間に指数関数的関係がみられ (Fig. 2a), また腫瘍移植後

7日以降においては%体重と腫瘍体積の増加には強い負の相関がみとめられたこと (Fig. 2b) より%体重の減少抑制により腫瘍の増大抑制を評価することが可能となった。

4・2 各 effector 細胞投与による局所免疫反応および抗腫瘍効果について

4・2・1 各 effector 細胞の特徴

本研究において使用した effector 細胞は正常ラット脾細胞, 免疫脾細胞, TIL, および LAK 細胞である。それぞれが多彩な細胞群を含み, 機能, 性質を比較するのは必ずしも容易ではないが, いくつかの特徴があげられる。表面マーカーの検索では, 正常脾細胞および免疫脾細胞の各リンパ球サブセットには大きな相違はなく, 10B5 (CD8) 陽性細胞と W3/25 (CD4) 陽性細胞の比率がほぼ 1:1 となっている。TIL では 3B3 (CD5) 陽性細胞が著明に増加 (78.0%) し, かつ CD8:CD4 は約 10:1 と killer/suppressor T 細胞マーカーを有する細胞が増加している。

LAK 細胞においても 3B3 陽性細胞が 63.1% と増加しているが, CD8:CD4 は約 1.5:1 と helper/inducer T 細胞マーカーを有する細胞も比較的保たれている。この結果は Vujanovic *et al.*²⁴⁾ が脾細胞より誘導した

ラット LAK 細胞の主体は OX8(CD8) (+), R1-3B3 (-), W3/25(-)であることとほぼ一致する。1A6 陽性(単球/Mφ)細胞は正常および免疫脾細胞でそれぞれ 19.4, 15.4%であり, TIL, LAK 細胞ではその 1/4~1/5 となっていた。

これら各 effector 細胞の *in vitro* における殺細胞能をみてみると, 正常および免疫脾細胞では NK 活性が認められるにすぎなかったが, TIL は T9 細胞に特異的な CTL 活性を示し, 一方 LAK 細胞は K562, Daudi, T9 細胞いずれの target に対しても殺細胞能を示した。正常脾細胞と免疫脾細胞における相違は, 後者において T9 細胞に対する CTL 前駆細胞が含まれている事である²⁵⁾が, 表面マーカーおよび 4 hr ⁵¹Cr release assay における殺細胞効果においてはほとんど差が認められなかった。

免疫学的腫瘍拒絶における腫瘍の退縮過程では, まず腫瘍局所に好中球, Mφ の浸潤がみられ²⁶⁾, 次いで helper T 細胞, CTL 浸潤が認められるようになり腫瘍退縮が引き起こされる。好中球はリンパ球遊走因子(LMF)²⁶⁾を産生, Mφ は IL-1, CSF を産生して自己の増殖や helper T 細胞を活性化し, helper T 細胞は IL-2, CGF 等の lymphokine を産生することにより CTL の分化, 増殖を促す²⁵⁾。このような cytokine に媒介された一連の細胞反応のカスケードが腫瘍拒絶の機構と思われる。本実験においては, T9 細胞は CTL を誘導する¹⁶⁾ため上記の CTL を介した腫瘍拒絶が宿主側の反応として引き起こされる可能性があるが, 局所投与された effector 細胞がその直接効果の他にどのような機構で, どのような宿主反応を引き起こすかを考察したい。

正常脾細胞の投与によって通常の NK 細胞が腫瘍内に投与されることになる。T9 細胞は class I 抗原を発現し NK 細胞に対して感受性がなく, 投与されたリンパ球は腫瘍内において感作され得ると思われるが, CTL を誘導するまでには複雑な過程を必要とするため²⁷⁾即時効果は期待しにくいと思われる。免疫脾細胞投与では CTL 前駆細胞を含むため, helper T 細胞による分化の最終段階が終了されれば成熟 CTL となり抗腫瘍効果が期待できる。この最終分化に必要な helper 因子として CGF が同定されている²⁸⁾が, Mφ の仲介を介さず直接 CTL 前駆細胞を分化させ得るとされている。仮に Mφ などの抗原呈示細胞の存在が必要とされても, 免疫脾細胞内の 1A6 陽性細胞の比率は 15.4%であり十分量が含まれていると思われる。TIL は CTL として T9 細胞に対し即時的殺細胞効果を示し, その治療効果が期

待されるが, helper T 細胞比率が低く, 長時間クローンが維持されない可能性がある²⁹⁾。LAK 細胞も TIL 同様, 即時的殺細胞効果が期待される。通常 LAK 療法においては LAK 細胞の維持のため IL-2 投与が不可欠とされている³⁰⁾が, T9 皮下腫瘍に対する LAK 局所投与において IL-2 投与が必ずしも抗腫瘍効果に必要でないこと³¹⁾, helper T 細胞の比率が比較的高く維持されていることから高い効果が得られる可能性がある。

4.2.2 各 effector 細胞投与による局所反応

正常脾細胞の腫瘍内投与では, 1A6 陽性細胞の浸潤が強まる以外に, 未治療群と大差がみられなかった。免疫脾細胞投与では 3B3, 10B5, W3/25, 1A6, asialo GM₁ 陽性細胞のいずれも, 3 日目において周囲組織への浸潤が強まり, 一定の潜伏期において細胞反応のカスケードが働くように思われた。この潜伏期の存在についての意義は不明であるが, 免疫脾細胞の示す 2 次免疫反応の誘導と関連があるかも知れない³²⁾。

TIL 投与では, 翌日に腫瘍周辺に強い細胞浸潤がみられるにもかかわらず, 3 日目にはほとんど認められなくなっている。当初認められた浸潤リンパ球が投与した TIL である可能性も否定できないが, 少なくとも各種サブセットからなる細胞反応カスケードが回転しないことは, TIL 中に含まれる helper 細胞の量的欠乏が関与している可能性がある³³⁾。これらに対し, LAK 細胞投与群では, 投与翌日より killer/suppressor T 細胞の浸潤があり, 3 日後には更に 1A6, W3/25, asialo GM₁ 陽性細胞の浸潤も加わり, 多彩な細胞反応が認められるようになる。これにはやはり LAK 細胞の直接効果のみならず, LAK 細胞のもつ helper 機能あるいは LAK 細胞中に含まれる helper T 細胞の関与を考えなくてはならないと思われる。

4.3 担癌宿主の免疫能

脳内に移植された腫瘍が免疫学的に部位的特異性を示すか否かを, 皮下腫瘍の系と Con A, MLTC 反応性において比較検討した。Fig. 9 に示すように Con A に対する反応性は皮下, 脳内共に増加する傾向にあった。また, MLTC で 7 日をピークにして反応性の増大が認められた。この事は mitogen 刺激による非特異的の反応, および T9 細胞を認識する細胞群の反応性が亢進していることを意味し, 移植脳腫瘍が必ずしも全身免疫系により隔絶されていない事を示している。上出ら³⁴⁾は脳腫瘍ラットにおいて担癌 3 日目より抑制的 Mφ が脾内に出現することを示しているが, 本実験においては少なくとも 2 週間以内では明らかな免疫抑制反応は認められていない。これは彼らのモデルにおける KMT-17

fibrosarcoma と T9 細胞において抗原性、生物学的性質に相違があること、また彼らのラットの平均生存日数が11日と、本モデルの1/2の期間でしかないことも関与しているかも知れない。本モデルにおいては、免疫脾細胞、LAK 細胞投与により宿主由来リンパ球の腫瘍内浸潤が観察され、従って脳腫瘍移植後10日目に各 effector 細胞を投与することは宿主の亢進した免疫反応性に関連して腫瘍排除反応が引き起こされ、未知の効果を引き出す可能性があるものと思われる。

5 要 約

Fisher ラット由来 gliosarcoma T9 細胞を移植した脳腫瘍モデルを作製し、脳腫瘍に対する adoptive immunotherapy の効果について解析した。

1) 本脳腫瘍モデルは従来のものに比べ、より自然発生腫瘍に近くより長期間の経過観察が可能であり、effector 細胞の腫瘍局所における免疫反応の解析に適していた。

2) 脳腫瘍の増大と体重増加には負の相関がみられ、体重増加曲線を解析することにより *in vivo* における抗腫瘍効果を早い時期からとらえることが出来た。

3) 免疫ラット脾細胞を局所投与することにより3日後には killer/suppressor T 細胞による反応が誘導されたが、*in vivo* における治療効果は認められなかった。

4) TIL の局所投与により killer/suppressor T 細胞による反応が見られたが、3日後には免疫反応は維持されることなく消退した。

5) LAK 細胞は移入後から腫瘍局所に強い免疫反応を引き起こし、3日後まで反応は維持され、*in vivo* でも有意な抗腫瘍効果を認めた。

6) *In vivo* で抗腫瘍効果をあげるためには一定以上の細胞数の LAK 細胞投与が必要であった。

以上より脳腫瘍内への effector 細胞投与による局所免疫療法においては、直接の殺細胞効果の他に、宿主免疫反応が抗腫瘍効果の発現に重要と思われた。

本稿を終えるにあたり、御指導御校閲をいただいた本学脳神経外科学講座 端 和夫教授に深謝いたします。

また、実験を行なう際に終始御教示御助言をいただいた本学脳神経外科学講座 伊林至洋、八巻稔明、両博士に感謝いたします。

文 献

1. Greene, H. S. N.: The transplantation of human brain tumors to the brains of laboratory animals.

Cancer Res. **13**, 422-426 (1953).

2. Lorenzo, N. D., Palma, L. and Nicole, S.: Lymphocytic infiltration in long-survival glioblastomas: Possible hosts resistance. *Acta Neurochir.* **39**, 27-33 (1977).

3. Yamashita, J., Iwaki, K., Ohtsuka, S., Yamasaki, T., Gi, H., Keyari, A. and Handa, H.: Effects of Radiotherapy on non-specific immunological parameters in patients with malignant brain tumors. *Neurol. Med. Chir.* **23**, 361-369 (1983).

4. Tanaka, R., Sekiguchi, K., Suzuki, Y., Sobue, H., Takaeda, N. and Murakami, N.: Local immunotherapy of malignant brain tumors.: Evaluation of intratumoral injection of BCG and a Streptococcus Pyogenes preparation. *Neurol. Med. Chir.* **24**, 376-384 (1985).

5. Yamasaki, T., Handa, H., Yamashita, J., Watanabe, Y., Namba, Y. and Hanaoka, M.: Specific adoptive immunotherapy with tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte clone for murine malignant gliomas. *Cancer Res.* **44**, 1776-1783 (1984).

6. Cameron, D. J. and Churchill, W. H.: Cytotoxicity of human macrophages for tumor cells: Enhancement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J. Immunol.* **124**, 708-712 (1980).

7. Resenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A. E., Ettinghausen, S. E., Matory, Y. L., Skibber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J. T., Seipp, C. A., Simpson, C. and Reichert, C. M.: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* **313**, 1485-1492 (1985).

8. Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z. and Rosenberg, S. A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon: Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* **155**, 1823-1841 (1982).

9. Mazumder, A. and Rosenberg, S. A.: Successful immunotherapy of natural killer resistant established pulmonary melanoma metastasis by the intravenous adoptive transfer of syngeneic lymphocytes activated *in vitro* by interleukin 2. *J. Exp. Med.* **159**, 495-507 (1984).

10. Rosenstein, M., Ettinghausen, S. E. and Rosenberg, S. A.: Extravasation of intravascular fluid mediated by the systemic administration of recombinant interleukin 2. *J. Immunol.* **137**,

- 1735-1742 (1986).
11. Benda, P., Someda, K., Messer, J. and Sweet, W. H.: Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J. Neurosurg.* **34**, 310-323 (1971).
 12. Matuura, A., Ishii, Y., Yuasa, H., Narita, H., Kon, S., Takami, T. and Kikuchi, K.: Rat T lymphocyte antigens comparable with mouse Lyt-1 and yt-2, 3 antigenic systems: Characterization by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **132**, 316-322 (1984).
 13. Ishii, Y., Matsuura, A., Iwaki, H., Takami, T. and Kikuchi, K.: Two closely related antigens expressed on granulocytes, macrophages and some reticular elements in rat lymphoid tissues: Characterization by monoclonal antibodies. *Immunology* **51**, 477-487 (1984).
 14. White, R. A. H., Mason, D. W., Williams, A. F., Galfre, G. and Milstein, C.: T-lymphocyte heterogeneity in the rat: Separation of functional subpopulations using a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* **148**, 664-673 (1978).
 15. Solomon, F. R. and Higgins, T. J.: A monoclonal antibody with reactivity to asialo GM₁ and murine natural killer cells. *Mol. Immunol.* **24**, 57-65 (1987).
 16. Ibayashi, Y., Uede, T., Uede, T. and Kikuchi, K.: Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors.: Differential cytotoxicity of mononuclear cells from tumors of immune and non immune rats. *J. Immunol.* **134**, 648-653 (1985).
 17. Uede, T., Ishii, Y., Matsuura, A. and Kikuchi, K.: Thy-1 antigen on rat bone marrow cells: Immunochemical and fine morphological studies. *Tohoku J. Exp. Med.* **136**, 391-404 (1982).
 18. Ibayashi, Y., Hoon, D. S. B. and Golub, S. H.: The regulatory effect of adherent cells on lymphokine activated killer (LAK) cells. *Cell. Immunol.* **110**, 365-378 (1987).
 19. Albright, L., Madigan, J. C., Gaston, M. R. and Houchens, D. P.: Therapy in an intracerebral murine glioma model, using Bacillus Calmette-Guerin, Neuraminidase-treated tumor cells, and 1-(2-Chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea. *Cancer Res.* **35**, 658-665 (1975).
 20. Hsu, S., Raine, L. and Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 577-580 (1981).
 21. Cochran, W. G.: Analysis of variance: Its nature and uses. *Biometrics* **13**, 261-281 (1957)
 22. Kokunai, T. and Kuwamura, K.: Effect of perfluorochemicals on BCNU chemotherapy in a 9L Rat Brain Tumor model. *Neurol. Med. Chir.* **22**, 777-783 (1982).
 23. Ishii, Y., Matsuura, A., Takami, T., Uede, T., Ibayashi, Y., Uede, T., Imamura, M., Kikuchi, K. and Kikuchi, Y.: Lymphoid cell subpopulations infiltrating into autologous rat tumor undergoing rejection. *Cancer Res.* **44**, 4053-4058 (1984).
 24. Vujanovic, N. L., Herbermann, R. B., Olszowy, M. W., Cramer, D. V., Salup, R. R., Reynolds, C. W. and Hiserodt, J. C.: Lymphokine-activated killer cells in rats: Analysis of progenitor and effector cell phenotype and relationship to natural killer cells. *Cancer Res.* **48**, 884-890 (1988).
 25. Uede, T., Kohda, H., Ibayashi, Y., Osawa, H., Diamanstein, T. and Kikuchi, K.: Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors.: II. Differential ability of mononuclear cells obtained from various tissues to produce helper factors that are involved in the generation of cytotoxic cells. *J. Immunol.* **135**, 3243-3251 (1985).
 26. Yamaki, T., Uede, T., Shijubo, N. and Kikuchi, K.: Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors.: III. Soluble factors involved in the regulation of T lymphocyte infiltrating into tumors. *J. Immunol.* **140**, 4388-4396 (1988).
 27. Wagner, H., Hardt, C., Heeg, K., Pfizenmaier, K., Solbach, W., Bartlett, R., Stockinger, H. and Röllinghoff, M.: T-T cell interactions during cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses: T cell derived helper factor (interleukin 2) as a probe to analyze CTL responsiveness and thymic maturation of CTL progenitors. *Immunol. Rev.* **51**, 215-255 (1980).
 28. Murakami, T., Uede, T., Shijubo, N., Torimoto, Y., Ide, T., Sugimura, K., Azuma, I., Takai, Y. and Kikuchi, K.: Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors.: IV. Purification and functional characterization of cytotoxic cell-generating factor. *J. Immunol.* **141**, 4235-4242 (1988).
 29. Shu, S. and Rosenberg, S. A.: Adoptive immunotherapy of a newly induced sarcoma.: Immunologic characteristics of effector cells. *J.*

- Immunol.** **135**, 2895-2903 (1985).
30. Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z. and Rosenberg, S. A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon: Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by autologous human peripheral blood lymphocytes. **J. Exp. Med.** **155**, 1823-1841 (1982).
31. Yamaki, T., Ibayashi, Y., Kawahara, T., Daibo, M., Nakamura, T., Tanabe, S. and Hashi, K.: Fundamental analysis of immunotherapy of brain tumor by intratumoral infusion of LAK cells. **Neuroimmuno. Res.** **1**, 242-249 (1988).
32. Plata, F., Cerettini, J. C. and Brunner K. T.: Primary and secondary in vitro generation of cytotoxic T lymphocytes in the murine sarcoma virus system. **Fur. J. Immunol.** **5**, 227-233 (1975).
33. Hancock, E. J., Kilburn, D. G. and Levy, J. G.: Helper cells active in the generation of cytotoxicity to a syngeneic tumor. **J. Immunol.** **127**, 1394-1397 (1981).
34. 上出利光, 佐藤 修, 井口 進, 菊池浩吉: 実験的脳腫瘍ラットにおける細胞性免疫抑制の機序. **脳神経外科** **9**, 503-508 (1981).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学脳神経外科 川原孝久