

氏名・（本籍） 沼 謙 司（滋賀県）  
学位の種類 医学博士  
学位記番号 医博第67号  
学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当  
学位授与年月日 平成2年3月24日  
学位論文題目 レクチン固定化材料を用いた癌治療の試み

審査委員 主査 教授 服 部 隆 則  
副査 教授 小 玉 正 智  
副査 教授 森 渥 視

## 論 文 内 容 要 旨

### 〔目 的〕

癌に対するさまざまな免疫療法が試みられている。なかでも1982年に、S. Rosenbergらにより考案された、lymphokine activated killer (LAK) 細胞を用いたLAK養子免疫療法（LAK療法）は、本邦各施設でも実際に臨床応用されているが、臨床例での有効性に関する報告はまだ少ない。このLAK療法の問題点は、LAK細胞誘導の頻雑さ、移入しうるLAK細胞数の不足、投与されたLAK細胞の腫瘍組織への集積性、同時投与されるInterleukin-2 (IL-2) の副作用、血中免疫抑制物質の存在などがあげられる。我々は、体外循環を利用してon-line systemにて生体の免疫系を賦活する新しい治療方法を開発、検討してきた。今回、レクチンの一つであるPokeweed Mitogen (PWM) の有するKiller 細胞誘導能を利用し、体外循環療法に応用するために、PWMを固定化した材料を作製し、そのKiller 細胞誘導能、抗腫瘍効果について検討した。

### 〔方 法〕

PWMの固定化：メチルメタアクリレートとジビニールベンゼンの共重合粒子にヒドロキシメチルメタアクリレート系ポリマーをコートしたものにPWMを共有結合で固定化した。このPWM固定化ビーズをミニカラムに充填した（PWM-C）。

PWM-Cによる抗腫瘍細胞誘導能（in vitro）：体外循環を模してPWM-Cを含むリンパ球活性化用の回路を作製し、健康正常人、担癌患者の末梢血より分離したリンパ球を、この回路を循環させることにより活性化した。対照群として無処置のリンパ球を用い、細胞障害活性を、

IL-2を添加培養したLAK細胞活性とも比較した。細胞障害活性は、NK感受性のK-562細胞とNK非感受性のDaudi細胞を用い<sup>51</sup>Cr放出試験で評価した。

ヌードマウスにおける抗腫瘍効果 (in vivo) :ヌードマウスの背部皮下に、ヒト胃ガン細胞由来のMKN-1腫瘍細胞を移植し担癌マウスを作製した。腫瘍径が約3mmとなった時点で、PWM-Cを通して循環接触刺激したヒト末梢血リンパ球を腫瘍周囲組織内に浸潤投与した。対照として、無刺激のヒト末梢血リンパ球を投与し、その腫瘍増殖を比較検討した。

PWM-Cを用いたDirect Hemoperfusion (DHP)による抗腫瘍効果: Japanese White種家兔の大腿筋肉内にVx2腫瘍を移植し担癌家兔を作製した。腫瘍移植第6日目に、10ml容量のPWM-Cを用いたDHPを施行し、その抗腫瘍効果を観察した。

#### 〔結果〕

PWM-Cによる抗腫瘍細胞誘導能 (in vitro) : PWM-Cを通して1時間循環接触刺激したヒト末梢血リンパ球を37℃ 5% CO<sub>2</sub>下で24時間培養することにより、NK細胞に感受性のK-562細胞に対する強い細胞障害活性を誘導できることを確認した。IL-2添加培養群と比較しても、より強い細胞障害活性を誘導することができた。NK非感受性のDaudi細胞に対しても同様に、強い細胞障害活性を誘導することができ、NK活性の増強のみならず、LAK様活性の誘導も可能であった。細胞障害活性誘導に要する時間の検討によると、PWM-Cとの1時間の循環接触刺激直後に施行した細胞障害試験においても、K-562細胞、Daudi細胞に対する細胞障害活性の増強を認め、その活性は24時間培養によりさらに増強され、24時間培養で48時間培養とはほぼ同程度まで活性化されることが判明した。癌患者の末梢血より採取したリンパ球を用いても、K-562細胞、Daudi細胞いずれに対しても、対照群との比較において強い細胞障害活性を誘導することができた。

ヌードマウスにおける抗腫瘍効果 (in vivo) : PWM-Cを通して循環接触刺激したヒト末梢血リンパ球を腫瘍周囲組織へ浸潤投与した治療群では、無処置リンパ球を投与した対照群に比べ、有意に腫瘍増殖抑制効果を認めた。

PWM-Cを用いたDHPによる抗腫瘍効果: PWM-Cを用いたDHPは、全例回路内凝固も認めず安全に施行することができ、PWM-Cを用いたDHP治療群では、無治療群に比べ、25日間にわたって有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた。

#### 〔考察〕

LAK療法は、さかんに臨床応用されてきたが臨床上的の有効性に関する報告はまだ少ない。その原因として、移入しうるLAK細胞数の不足、血中免疫抑制物質の存在などがあげられる。最近、Hollow fiber bioreactor systemを用いたLAK細胞大量培養法や、IL-2抑制因子などの免疫抑制物質除去のための血漿交換併用LAK療法の有効性が報告されている。現在まで、体外循環を利用した免疫賦活療法は、血漿交換療法やProtein-Aによる免疫吸着療法など、免疫抑

制物質を除去し生体で作動している免疫抑制機構を低下させ、生体の免疫反応能力を増強させることを主な目的とするものであった。今回、PWMが短時間の刺激で強い抗腫瘍活性を誘導できることを利用し、この材料を体外循環用材料として応用した。ヒト末梢血リンパ球を、PWM-Cを通して1時間循環接触刺激することにより、NK活性の増強とLAK様活性の誘導が可能であり、また担癌患者のリンパ球も同様に活性化が可能であった。しかも実験動物においてPWM-Cを用いたDHPによる抗腫瘍効果を確認できた。この材料と治療方法は、将来癌に対する強力な免疫賦活療法の一つになりうると考えている。

#### 〔結 論〕

PWM-Cを用いたDHP療法は、off-line systemであるLAK療法の問題点を解決し、より一般的に施行可能な癌免疫療法となりうる。

#### 学位論文審査の結果の要旨

本研究は、レクチンの1つであるpokeweed mitogen (PWM)の有するkiller細胞誘導能を利用し、末梢リンパ球による癌免疫療法の有用性を実験的に調べたものである。リンパ球を体外で活性化し、その細胞をin vivoに戻して癌を治療するために、PWMを合成高分子ビーズ表面に固定化し、ビーズ充填カラムを作製し、それにリンパ球を体外循環で接触させ、killer細胞の誘導能と活性化リンパ球の抗腫瘍効果を検討している。

得られた結果は次の通りである。

1. ヒト末梢リンパ球をPWM固定化ビーズ充填カラムに通し、1時間循環接触刺激することによりNK活性が増強され、さらにNK非感受性細胞に対する細胞障害活性も誘導できることが確認された。
2. リンパ球の細胞障害活性誘導に要する時間の検討において、PWM固定化ビーズ充填カラムとの1時間の循環接触刺激直後においても、細胞障害活性を認めた。さらに24時間培養することにより、その活性は増強され、48時間培養とほぼ同程度まで活性化されていることが確認された。
3. PWM固定化ビーズ接触刺激で、癌患者の末梢血より採取したリンパ球を用いても、細胞障害活性を誘導できることが確認された。
4. MKN-1腫瘍(ヒト胃癌培養株)担癌ヌードマウスを用いたin vivoの実験において、PWM固定化ビーズ接触刺激で活性化されたリンパ球を動物に移入することで抗腫瘍効果が確認された。
5. Vx2腫瘍(家兔扁平上皮癌移植系)担癌家兔で、この材料を用いたdirect hemoperfusion (DHP)による体外循環治療実験において、DHPは安全に施行することができ、腫瘍増殖

抑制効果が確認された。

本研究は、体外循環を利用し、レクチンでリンパ球に killer 細胞活性を誘導し、癌の免疫療法を行う実際的な方法を確立したものであり、医学博士の学位論文に値すると認められる。