

# 酸素濃度の lymphokine activated killer (LAK), natural killer (NK) 活性におよぼす影響

— 養子免疫療法との関連において —

奈良県立医科大学第3内科学教室

木本 誠

## EFFECTS OF OXYGEN CONCENTRATION ON LYMPHOKINE ACTIVATED KILLER (LAK) AND NATURAL KILLER (NK) ACTIVITIES — ITS ASSOCIATION WITH ADOPTIVE IMMUNOTHERAPY —

MAKOTO KIMOTO

*The Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University*

Received January 8, 1992

*Summary*: The culture of lymphocytes is usually performed in an incubator at the atmospheric oxygen concentration (about 20%). But in vivo lymphocytes exist in an oxygen concentration of less than 20%. I investigated the effects of various oxygen concentrations on lymphokine activated killer (LAK) and natural killer (NK) activities. The oxygen tension of arterial blood and venous blood are about 90~100 mmHg and 40 mmHg. The cultures were performed at 20%, 5%, and 2% oxygen concentrations using an N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> incubator, because the dissolved oxygen partial pressure of the culture medium is about 90 mmHg at 5% oxygen concentration and about 40 mmHg at 2% oxygen concentration in the incubator. The LAK and NK activities of the lymphocytes that were cultured with recombinant interleukin 2 (rIL-2) at 2% or 5% oxygen concentration for three days significantly decreased in comparison with those at 20% oxygen concentration. However, there was no difference in cell viability, CD-16 positive/Leu-7 negative cell population, or IL-2 receptor  $\beta$  (IL-2R $\beta$ ) chain positive cell population between the lymphocytes of the 2% oxygen culture and those of the 20% oxygen culture. The lymphocytes which were once activated with rIL-2 at 20% oxygen concentration for three days killed Daudi and K 562 cells under the condition of 2% oxygen concentration to the same degree as under that of 20% oxygen concentration. In other words, activated LAK and NK cells were capable of killing the tumor cells at 2% oxygen concentration, but oxygen is important for induction and maintenance of LAK and NK activities. Our results indicate the possibility that high levels of cytotoxic activity can be induced and preserved in vivo by oxygen supplement with breathing in the patient who receives adoptive immunotherapy against malignant tumor.

### Index Terms

oxygen concentration, lymphokine activated killer, natural killer, adoptive immunotherapy

## 緒 言

近年、各種の癌に対して養子免疫療法が広く行われるようになり、腎癌、メラノーマ、脳腫瘍などに対しては高い抗腫瘍効果が認められている。しかし、その他の癌に対してははまだ十分な治療効果が得られていない<sup>1)~3)</sup>。このことは各腫瘍によりLAK細胞の抗腫瘍作用に対して感受性の高低があることを示している。したがって、さらに高いLAK活性を誘導することができれば、感受性の低い腫瘍に対しても治療効果を高めうる可能性が考えられる。ところで、Ghoshら<sup>4)</sup>は、IL-2投与により誘導されるLAK細胞の細胞傷害活性がin vivoとin vitroで異なり、in vivoではin vitroで認められるほど高い細胞傷害活性を誘導できないことを報告している。このin vivoとin vitroの差が何に基づくかは明らかではないが、リンパ球が存在する環境内の酸素濃度の違いが関与している可能性がある。すなわちin vitroでのリンパ球培養は、通常大気中の酸素濃度(20%, 150 mmHg)下で行われるのに対し、in vivoでのリンパ球は、大気中より低い酸素濃度(動脈血90~100 mmHg, 静脈血40 mmHg, 末梢組織30~60 mmHg)<sup>5)</sup>下におかれている。そこで、著者はIL-2によるLAK活性、NK活性の誘導ならびにこれらの細胞傷害作用に及ぼす酸素濃度の影響について、養子免疫療法の効果との関連において検討を加えた。

## 材料と方法

### 1. ヒトリンパ球の分離法

健康成人のヘパリン加末梢血よりFicoll-Conray比重遠心法<sup>6)</sup>にて単核細胞を分離し、ハンクス液(ニッスイ製薬)にて3回遠心、洗浄した。Ficoll-Conray溶液は、9% Ficoll (Pharmacia Fine Chemicals) と33.4% Conray-400(第一製薬)を24:10の割合で混和して作製した。

### 2. Recombinant interleukin 2 (rIL-2)

rIL-2は武田製薬社製の遺伝子組換えヒトIL-2を10 u/mlの濃度にて用いた。このrIL-2の1単位は400国際単位に相当する。

### 3. 低酸素濃度培養条件

N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養器(BNP-100, タバイ・エスベック社製)内に窒素ガスを加え、培養器内の酸素濃度を5%および2%に設定してリンパ球培養を行った。培養器内の酸素濃度を5%および2%にすると、培養液中の酸素分圧はそれぞれ動脈血中酸素分圧(100 mmHg)および静脈血中酸素分圧(40 mmHg)に等しくなる。また、対照実験と

して通常のCO<sub>2</sub>培養器を用いて酸素濃度を大気中の酸素濃度(約20%)にし、それ以外は同一条件でリンパ球を培養した。なお、同じ検体については同時に2種類の酸素濃度下でしか実験ができなかったため、各測定値の比較は、20%酸素濃度下と5%酸素濃度下、および20%酸素濃度下と2%酸素濃度下の間で行った。

### 4. 細胞培養

培養はすべて、L-グルタミン(0.3 mg/ml)とカナマイシン(0.08 mg/ml)を添加したRPMI 1640(ニッスイ製薬)培養液に5% fetal bovine serum(FBS)を加えて行った。

LAK活性とNK活性の誘導は10<sup>7</sup>個のリンパ球を5% FBSとrIL-2(10 u/ml)を加えたRPMI 1640培養液(10 ml)中で行った。

リンパ球の生存率は0.25%(w/v)プロナーゼ(生化学工業社製)処理後、トリパンブルーにて核染色を行って算出した<sup>7),8)</sup>。

### 5. LAK活性、NK活性の測定

LAK活性およびNK活性の測定には、それぞれDaudi細胞(Burkitt lymphoma), K 562細胞(human erythroleukemia)を標的細胞として用い、<sup>51</sup>chromium(<sup>51</sup>Cr) release assay法<sup>9),10)</sup>にてLAK細胞、NK細胞の細胞傷害活性を測定した。すなわち、10% FBSを含んだRPMI 1640培養液(0.5 ml)中に10<sup>6</sup>個の標的細胞と0.1 mCiの<sup>51</sup>Cr(NEN)を加え37℃で60分間培養し標識した後、ハンクス液にて5回洗浄し、5% FBSを含んだRPMI 1640培養液で10<sup>5</sup>細胞/mlに調整した。次いで、丸底型96穴のプレート(Nunc社)に0.1 mlの標的細胞(target cell)浮遊液と、10<sup>7</sup>細胞/mlから3×10<sup>5</sup>細胞/mlまで段階希釈した細胞数のリンパ球(effector cell)液0.1 mlを加え37℃で5時間培養した。培養後、0.1 mlの培養上清を静かに集め、そこから放出されるガンマー線量をオートガンマーカウンター(auto-gamma 5000, Packard)にて測定した。細胞傷害活性は次の式より計算した。

細胞傷害活性(%)=

$$\frac{\text{実験群解離(cpm)} - \text{自然解離(cpm)}}{\text{最大解離(cpm)} - \text{自然解離(cpm)}} \times 100$$

### 6. ヒト肝癌細胞に対するリンパ球の非特異的抗腫瘍活性の測定

リンパ球のヒト肝癌細胞(Alexander cell)に対する非特異的抗腫瘍活性は、LAK、NK活性測定と同様に<sup>51</sup>Cr release assay法にて測定した。10<sup>6</sup>個の標的細胞(Alexander cell)を0.1 mCiの<sup>51</sup>Crで標識し、ハンクス液にて

5回洗浄した。5% FBS を含んだ RPMI 1640 培養液で  $10^5$  細胞/ml に調整した標的細胞浮遊液と  $10^7$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $10^6$ ,  $3 \times 10^5$  細胞/ml に段階希釈したリンパ球 (effector cell) 浮遊液とをそれぞれ 0.1 ml ずつ丸底型 96 穴のプレートに加え 5 時間培養し、0.1 ml の培養上清中のガンマー線量をオートガンマーカウンターにて計測した。細胞傷害活性は LAK 活性, NK 活性の測定と同様に算出した。

7. CD 16, Leu 7, IL-2 receptor (IL-2R) $\beta$  鎖陽性細胞のフローサイトメトリー解析

Phycoerythrin (PE) ラベル抗 Leu 11 モノクローナル抗体 (CD 16) (Becton Dickinson) と fluorescein isothiocyanate (FITC) ラベル抗 Leu 7 モノクローナル抗体 (Becton Dickinson) をそれぞれ 20  $\mu$ l ずつ  $10^6$  個 (50  $\mu$ l) のリンパ球に加え 4  $^{\circ}$ C, 30 分間反応させ、0.01 M の PBS (phosphate-buffered saline) にて洗浄後、FACStar<sup>TM</sup> (Becton Dickinson) を用いて CD 16, Leu 7 陽性細胞数を測定した。

また、抗 IL-2R $\beta$  鎖抗体: MiK- $\beta$  1<sup>11)</sup> (ニチレイ社) を用い、IL-2R $\beta$  鎖陽性リンパ球数とリンパ球 1 個当りの IL-2R $\beta$  鎖の平均表出量を FACStar<sup>TM</sup> を用いて測定した。

結 果

1. リンパ球の生存率に及ぼす酸素濃度の影響

10 u/ml の rIL-2 を加え 20% および 2% 酸素濃度下で培養したリンパ球の生存率は 1, 3, 5, 7 日と培養期間が長くなるにしたがって低下し、どの時点においても 2% 酸素濃度下での生存率と 20% 酸素濃度下での生存率との間に有意な差は認められなかった (Fig. 1)。

2. LAK 活性の誘導に及ぼす酸素濃度の影響

3 日間 rIL-2 (10 u/ml) とともに培養したリンパ球の LAK 活性を effector target ratio (E : T ratio) 3 : 1, 10 : 1, 30 : 1, 100 : 1 の 4 条件で測定したところ、5% 酸素濃度下で培養したリンパ球の LAK 活性は、20% 酸素濃度下で培養したリンパ球に比べどの E : T ratio においても有意に低下していた ( $P < 0.05$ )。また、2% 酸素濃度下で培養したリンパ球の LAK 活性は、5% 酸素濃度下よりもさらに著明な低下を示した ( $P < 0.001$ ) (Fig. 2)。

3. NK 活性の誘導に及ぼす酸素濃度の影響

rIL-2 (10 u/ml) を加え 3 日間培養したリンパ球の NK 活性を測定したところ、5% 酸素濃度下で培養したリンパ球の NK 活性は、20% 酸素濃度下で培養したリンパ球に比べ E : T ratio 30 : 1 以下で有意に低下してい

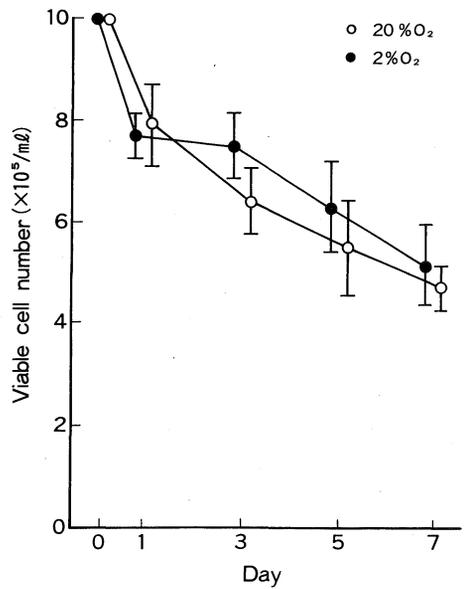


Fig. 1. Cell viability of cultured peripheral blood mononuclear cells (PBMC) under oxygen-limited conditions with rIL-2 (10u/ml) for 7 days. The number of the viable cells was counted with trypan blue nuclear staining after pronase treatment. Those PBMC were cultured at 20% oxygen concentration (○) and 2% (●).

た ( $P < 0.05$ )。2% 酸素濃度下で培養したリンパ球の NK 活性は、5% 酸素濃度下よりもさらに強い低下を示した ( $P < 0.01$ ) (Fig. 3)。

4. リンパ球中の NK 細胞数に及ぼす酸素濃度の影響

10 u/ml の rIL-2 とともに 3 日間培養したリンパ球中の NK 細胞数を測定するため、リンパ球表面の CD 16 と Leu 7 抗原の two color 分析を行った結果では、2% および 5% 酸素濃度下で培養したリンパ球中の CD 16 陽性, Leu 7 陰性細胞数は、20% 酸素濃度下で培養したリンパ球中の CD 16 陽性, Leu 7 陰性細胞数と変わらなかった (Table 1)。

5. IL-2R $\beta$  鎖陽性細胞数と IL-2R $\beta$  鎖表出量に及ぼす酸素濃度の影響

抗 IL-2R $\beta$  鎖抗体 (MiK- $\beta$  1) を用いてリンパ球表面の IL-2R $\beta$  鎖陽性細胞数とその表出量を測定したところ、20% 酸素濃度下で 2 日間 rIL-2 (10 u/ml) とともに培養したリンパ球の IL-2R $\beta$  鎖陽性細胞数は、 $6.2 \pm 0.7$  (mean  $\pm$  SD)% で、2% 酸素濃度下で培養したリンパ球では  $6.9 \pm 1.7$ % と有意な差はみられなかった。また、リンパ球 1 個あたりの IL-2R $\beta$  鎖の平均表出量も、20%

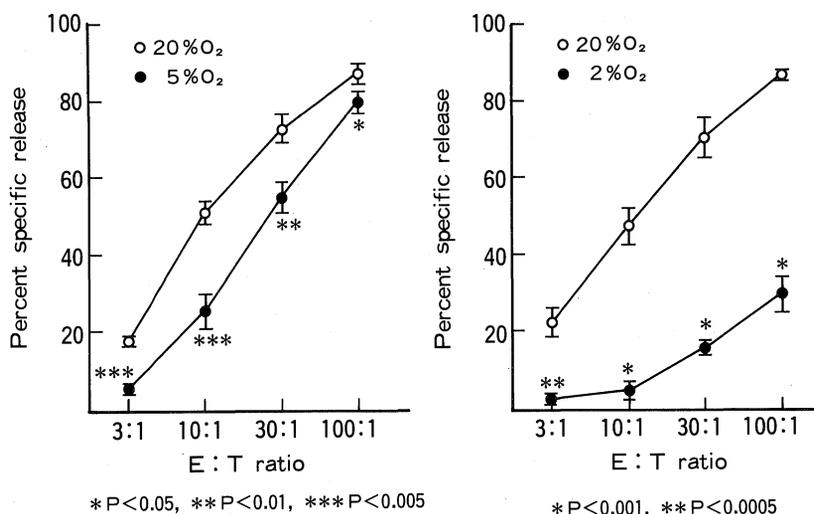


Fig. 2. Induction of LAK activity in oxygen-limited conditions in continuous culture with rIL-2 (10u/ml) for three days. <sup>51</sup>Cr-labeled Daudi cells were used as a target cell for LAK activity assay. A constant number of 10<sup>4</sup> <sup>51</sup>Cr-labeled target cells (0.1ml) were incubated with various number of effector cells (0.1ml) in the round-bottom 96-well plates at the E : T ratio of 3 : 1, 10 : 1, 30 : 1, and 100 : 1. Those cultures in triplicate were performed at 37°C in the humidified incubator for 5 h. The PBMC were cultured for three days at 20% oxygen concentration (-○-) and 5% (-●-) in the left figure, and at 20% oxygen concentration (-○-) and 2% (-●-) in the right figure.

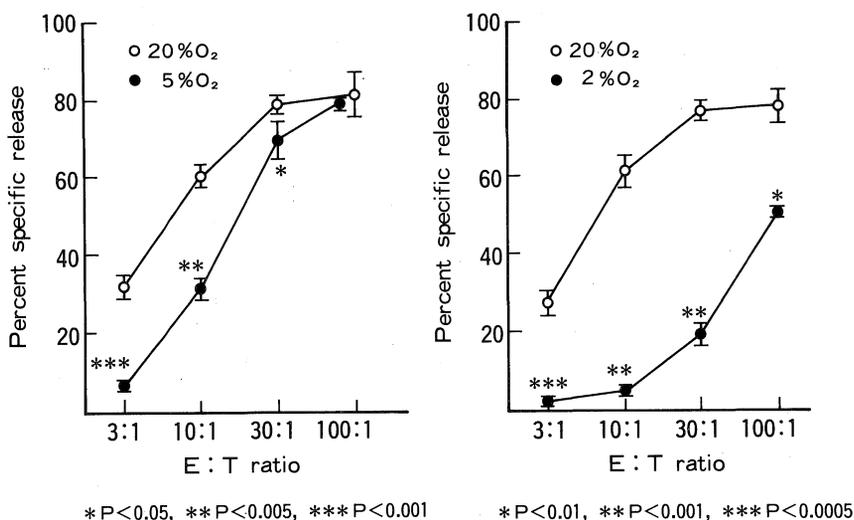


Fig. 3. Induction of NK activity in oxygen-limited conditions in continuous culture with rIL-2 (10u/ml) for 3 days. K562 cells were used as a target cell. The PBMC were cultured for three days at 20% oxygen concentration (-○-) and 5% (-●-) in the left figure, and at 20% oxygen concentration (-○-) and 2% (-●-) in the right figure.

Table 1. The number of NK cells in cultured lymphocytes under oxygen-limited conditions

	<sup>a</sup> Leu-7(-) CD-16(-)	Leu-7(+) CD-16(-)	Leu-7(-) CD-16(+)	Leu-7(+) CD-16(+)
<sup>a</sup> 20%	76.6±5.2%	7.4±0.8%	7.1±2.1%	8.9±2.4%
<sup>b</sup> 5%	74.8±4.7%	9.3±1.3%	8.6±1.1%	7.3±1.8%

	<sup>a</sup> Leu-7(-) CD-16(-)	Leu-7(+) CD-16(-)	Leu-7(-) CD-16(+)	Leu-7(+) CD-16(+)
<sup>a</sup> 20%	77.0±4.0%	8.1±3.5%	6.5±1.1%	8.5±4.7%
<sup>c</sup> 2%	75.8±4.8%	9.8±3.3%	8.4±3.1%	6.0±2.7%

The lymphocytes were cultured with rIL-2 (10u/ml) for three days at <sup>a</sup>20%, <sup>b</sup>5%, and <sup>c</sup>2% oxygen concentrations.

<sup>d</sup>The surface Leu-7 positive (+) or negative (-) lymphocytes and CD-16 positive (+) or negative (-) lymphocytes were investigated by two color analysis.

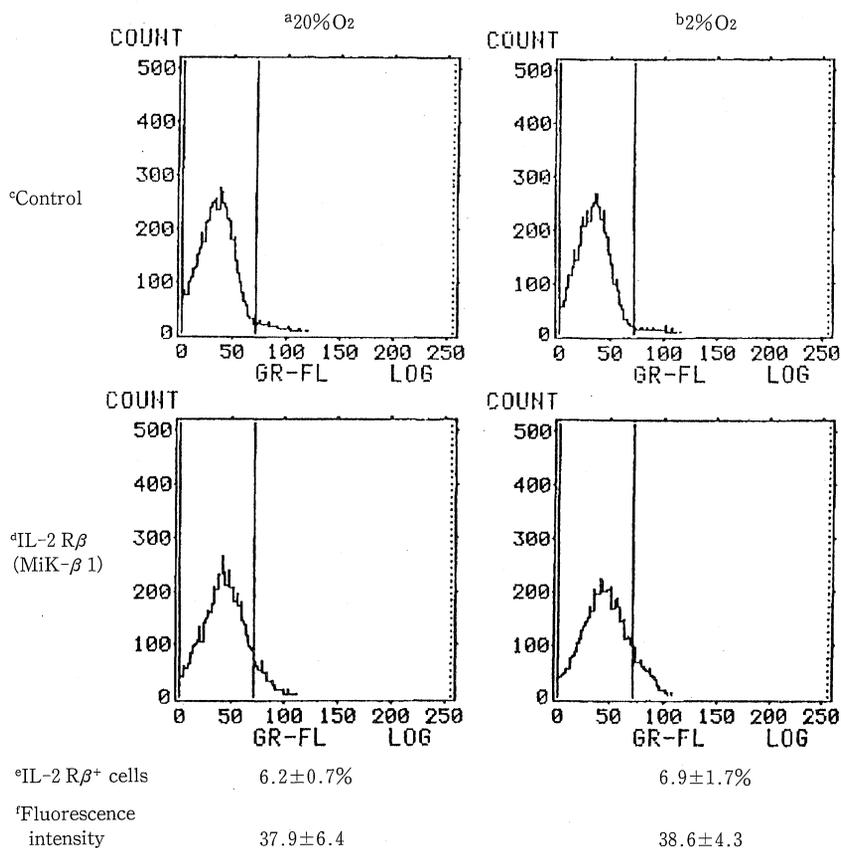


Fig. 4. The expression of surface IL-2R β chain on lymphocytes cultured under oxygen-limited conditions. IL-2R β chain on surface of the lymphocytes that were cultured at <sup>a</sup>20% and <sup>b</sup>2% oxygen concentrations with rIL-2 (10u/ml) for two days, were analyzed by the MiK-β 1 antibody with flow microfluorometry (FMF).

<sup>c</sup>Non specific fluorescence (only FITC-conjugated anti mouse IgG antibody).

<sup>d</sup>Specific fluorescence (anti IL-2R β chain antibody (MiK-β 1) and FITC-conjugated anti mouse IgG antibody).

<sup>e</sup>Percent of IL-2R β chain positive lymphocyte.

<sup>f</sup>Fluorescence intensity of lymphocyte surface IL-2R β chain.

酸素濃度下  $37.9 \pm 6.4$ , 2%酸素濃度下  $38.6 \pm 4.3$  と酸素濃度により差を認めなかった(Fig. 4).

6. LAK 活性誘導およびNK 活性誘導の kinetics に及ぼす酸素濃度の影響

10 u/ml の rIL-2 を加え培養したリンパ球の LAK 活性と NK 活性の kinetics を培養前と 1, 3, 5, 7 日目に E:T ratio 30:1 で測定した(Fig. 5). 20%酸素濃度下ではリンパ球の LAK 活性は培養 1 日目より上昇し, 3 日目をピークとして 7 日目まで高い LAK 活性を維持したのに対し, 2%酸素濃度下で培養したリンパ球では, 上昇の程度は弱く, 培養 3 日目をピークとして急激に低下した. また, NK 活性の kinetics も同様であり, 20%酸素濃度下では持続して高い NK 活性がみられたのに対し, 2%酸素濃度下では, 培養期間が長くなるにつれて NK 活性は急激に低下した.

7. 活性化された LAK 細胞, NK 細胞の細胞傷害作用に及ぼす酸素濃度の影響

3 日間 20%酸素濃度下で 10 u/ml の rIL-2 とともに培養して高い LAK 活性, NK 活性を得たリンパ球を用いて 20%, 5%, 2% の各酸素濃度の培養器内で LAK

細胞と NK 細胞の細胞傷害作用を測定したところ, いずれの酸素濃度下でも細胞傷害作用は影響を受けなかった(Fig. 6,7).

8. IL-2 再刺激後の LAK 活性, NK 活性への酸素濃度の影響

5 日間 20%酸素濃度下で 10 u/ml の rIL-2 とともに培養したリンパ球を 5 日目に再び同量の rIL-2 にて再刺激し, 以後 20%酸素濃度下と 2%酸素濃度下に分けて再培養して, 培養開始 5, 6, 8, 10 日目に LAK 活性および NK 活性の測定を E:T ratio 30:1 で行ったところ, 2%酸素濃度下にて培養したリンパ球の LAK 活性, NK 活性は経日的に急激に低下したのに対し, 20%酸素濃度下で培養したリンパ球は高い LAK 活性, NK 活性を維持した(Fig. 8).

9. リンパ球の肝癌細胞に対する非特異的抗腫瘍活性に及ぼす酸素濃度の影響

RIL-2 (10 u/ml) とともに 3 日間培養したリンパ球のヒト肝癌細胞(Alexander cell)に対する抗腫瘍活性をみると, 2%酸素濃度下にて培養したリンパ球の抗腫瘍活性は E:T ratio 10:1 以上で 20%酸素濃度下にて培

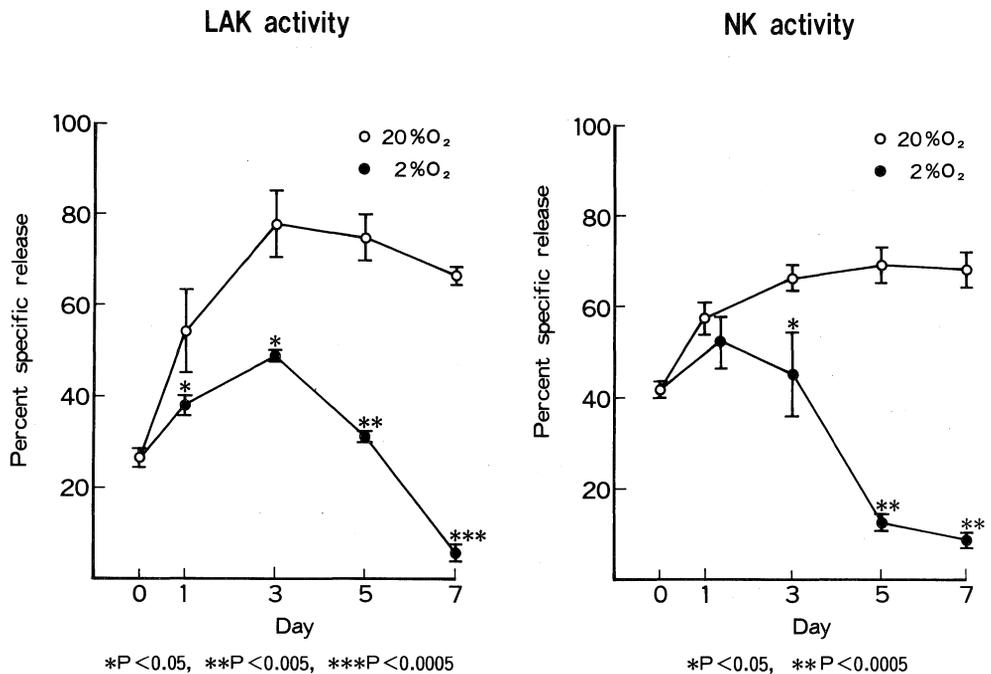


Fig. 5. Kinetics of LAK and NK activities at the E:T ratio of 30:1 in oxygen-limited conditions in continuous culture with rIL-2 (10u/ml). The LAK activities of PBMC cultured at 20% oxygen concentration (○) and 2% (●) in the left figure, and the NK activities at 20% oxygen concentration (○) and 2% (●) in the right figure were investigated on 0, 1, 3, 5, and 7 days.

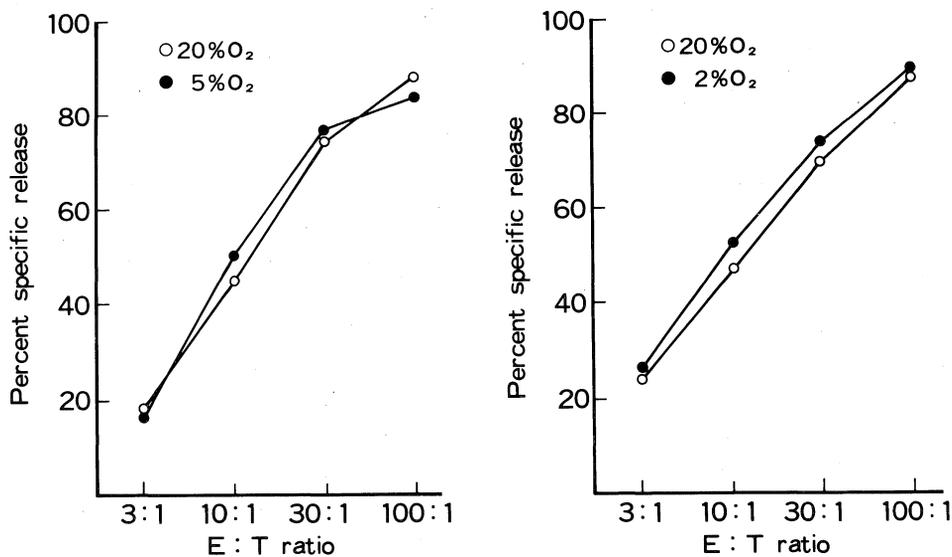


Fig. 6. Measurement of LAK cell-mediated lysis under conditions of oxygen limitation. The LAK activities of the PBMC which were cultured at 20% oxygen concentration with rIL-2 (10u/ml) for three days, were measured at 20% oxygen concentration (○) and 5% (●) in the incubator in the left figure, and at 20% oxygen concentration (○) and 2% (●) in the incubator in the right figure.

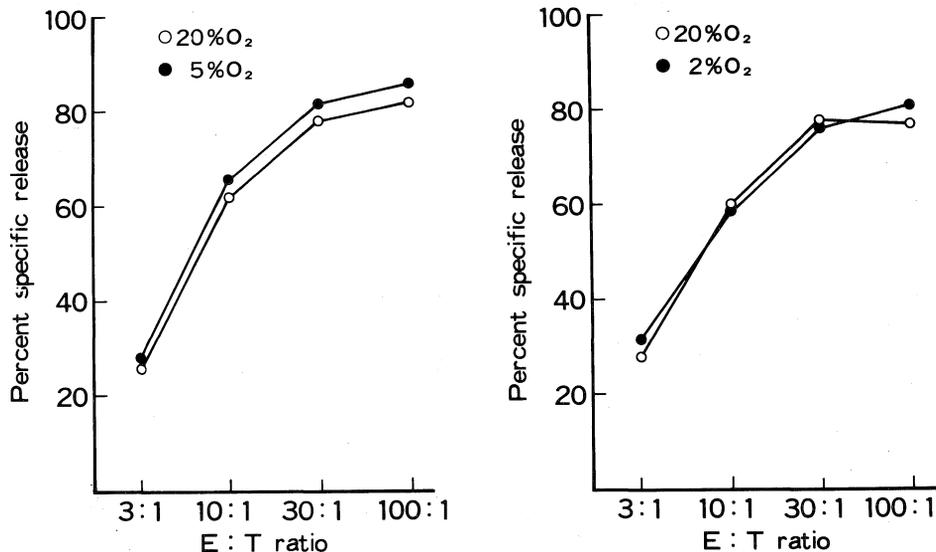


Fig. 7. Measurement of NK cell-mediated lysis under conditions of oxygen limitation. The NK activities of the PBMC which were cultured at 20% oxygen concentration with rIL-2 (10u/ml) for three days, were measured at 20% oxygen concentration (○) and 5% (●) in the incubator in the left figure, and at 20% oxygen concentration (○) and 2% (●) in the incubator in the right figure.

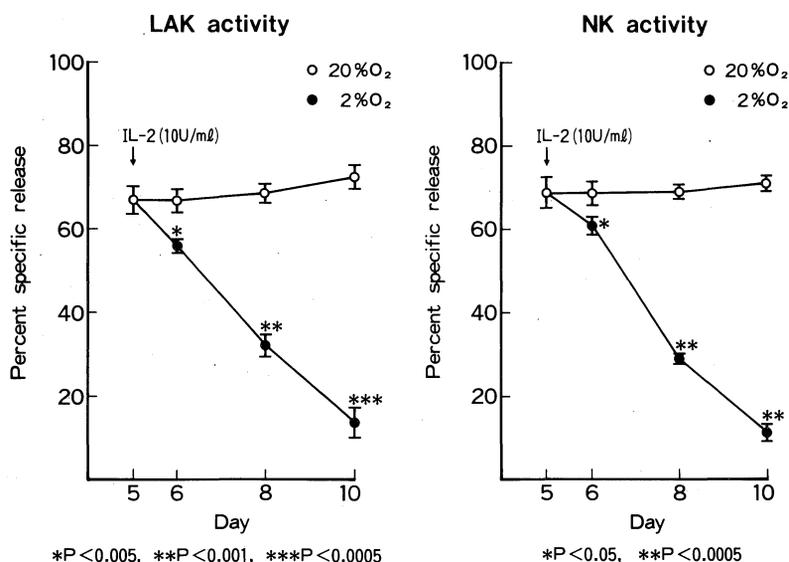


Fig. 8. Kinetics of LAK and NK activities of the PBMC at the E: T ratio of 30: 1, which were cultured with rIL-2 (10u/ml) for 5 days at 20% oxygen concentration and then restimulated with rIL-2 (10u/ml) under oxygen-limited conditions. LAK activities of restimulated PBMC at 20% oxygen concentration (-○-) and 2% (-●-) in the left figure, and NK activities at 20% oxygen concentration (-○-) and 2% (-●-) in the right figure were measured by <sup>51</sup>Cr release assay.

養したリンパ球の抗腫瘍活性より有意に低かった( $P < 0.001$ )(Fig. 9).

## 考 察

酸素濃度の違いは細胞の増殖や機能に様々な影響を及ぼすと言われている。たとえば、100%の酸素濃度下では、大気中の酸素濃度下と比してマウス線維芽細胞株(NCTC 929)やヒト皮膚上皮細胞株(NCTC 1469)などの細胞増殖は減少する<sup>12)</sup>一方、大気中より低い酸素濃度下の培養では大気中の酸素濃度下よりも African green monkey kidney cell(Vero cell, CCL-81)や human diploid cell(WI-38)の細胞増殖がさかんになると言われている<sup>13),14)</sup>。通常 LAK 活性, NK 活性の誘導や測定は大気中の酸素濃度下で行われているが、著者は、生体内では大気中に比べ低い酸素濃度下にリンパ球がおかれていることに着目し、酸素濃度を生体内と同じ条件にして LAK 活性や NK 活性、さらに非特異的抗腫瘍活性がどのような影響を受けるのかを検討した。

著者の実験では、IL-2 で LAK 活性, NK 活性を誘導する際に、5%または2%酸素濃度下で培養するとリンパ球の LAK 活性, NK 活性は20%酸素濃度下で培養したリンパ球に比べ低く、経日的観察でも2%酸素濃度下で LAK 活性, NK 活性の著明な低下がみられた。また、

リンパ球を20%酸素濃度下で培養し LAK 活性, NK 活性を誘導した後では低酸素濃度下でも腫瘍細胞を傷害した。しかし、そのリンパ球をさらに低酸素状態で再培養すると急激に LAK 活性, NK 活性は低下した。換言すると、酸素濃度は LAK 活性, NK 活性の誘導と維持に重要であったが、活性化された LAK 細胞, NK 細胞による細胞傷害作用には影響を及ぼさなかった。さらにヒト肝癌細胞に対する抗腫瘍効果の検討では2%酸素濃度下では、20%酸素濃度下で活性化したリンパ球に比べ顕著に抗腫瘍活性が低値であった。以上の成績は、現在の養子免疫療法のプロトコールでは生体内での酸素濃度が大気中より低いいため十分に抗腫瘍効果が発揮されていない可能性があることより、養子免疫療法を行う際に生体内で LAK 活性, NK 活性を効率よく誘導維持するためには、酸素濃度がきわめて重要であることを示唆している。したがって、癌患者に養子免疫療法を行う際に酸素療法を併用して末梢組織の中の酸素分圧を上げ、大気中の酸素分圧に近づけることによってより高い LAK 活性, NK 活性が誘導、維持され養子免疫療法の効果を高めうる可能性が示唆された。

次に培養器中の酸素濃度の低下がなぜ LAK 活性, NK 活性の低下を導いたかという点であるが、まず、リンパ球の生存率の低下によるものかを明らかにするため培

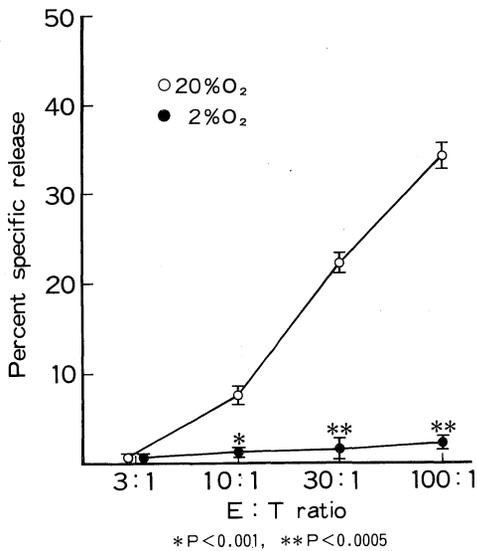


Fig. 9. Cytotoxicity of IL-2 induced PBMC under conditions of oxygen limitation against Alexander cells. Cytotoxic activity of the PBMC cultured with rIL-2 (10u/ml) for three days at 20% oxygen concentration (○) and 2% (●), was measured with <sup>51</sup>Cr-labeled Alexander cells as a target cell.

養リンパ球の生細胞数を調べたところ、20%、2%酸素濃度下で rIL-2 (10 u/ml) を加えて培養したリンパ球の生存率は7日目までともに低下し両者で有意な差はみられなかった。つまり、培養リンパ球の生存率は酸素濃度の影響を受けなかった。

次に、リンパ球中のNK細胞数の低下がNK活性の低下を導いた可能性を検討するためリンパ球のCD16とLeu7をFACSにて解析した。ほとんどのNK細胞はCD16陽性で、そのなかでもLeu7陰性のNK細胞が最も強いNK活性をもち、CD16、Leu7ともに陽性のNK細胞はやや弱いNK活性を持っているといわれている<sup>19)</sup>が、2%または5%酸素濃度下で培養したリンパ球のCD16陽性、Leu7陰性細胞数の比率は20%酸素濃度下で培養した場合と変わらなかった。以上の成績は、酸素濃度の低下によるNK活性の低下は生存細胞数ならびにNK細胞数の減少のためではないことを示唆している。なお、LAK細胞数についてはLAK細胞に特有な抗原が見いだされていないため測定できなかった。

ところで、形態学的にNK細胞と言われている large granular lymphocytes (LGL) は MW 55,000 peptide (p55) レセプター (IL-2R $\alpha$  鎖) と MW 75,000 peptide (p75) レセプター (IL-2R $\beta$  鎖) の2種類のIL-2レセプタ

ーを持っているが<sup>16)</sup>、IL-2によるNK細胞の活性化はIL-2R $\beta$ 鎖を通して行われる<sup>17)</sup>。そこで、リンパ球のIL-2R $\beta$ 鎖陽性細胞数とその表出量を測定したところ、20%と2%酸素濃度下の間では陽性細胞数にも表出量にも差がみられなかった。したがって、IL-2によって誘導されるNK活性が低酸素濃度下で低下するのはIL-2Rの発現が減少したためでもないと考えられる。

以上のように低酸素濃度下培養でLAK細胞、NK細胞の細胞傷害活性が低下するメカニズムはなお不明であるが、いくつかの可能性が考えられる。まず第一に、hydroxyl radical ( $\cdot$ OH) の阻害剤や、アラキドン酸代謝中のlipoxygenaseの阻害剤によりNK細胞の細胞傷害が抑制されることより、 $\cdot$ OHが直接かあるいはlipoxygenaseによる代謝物質を介して腫瘍細胞を傷害しているといわれている<sup>18)-20)</sup>が、低酸素濃度下での培養NK細胞は腫瘍細胞を傷害するために十分な $\cdot$ OHを持っていないことが考えられる。

第二に、NK細胞はパーフォリンとよばれる直径150-170Åの顆粒を標的細胞表面に出し、細胞膜に穴をあけてその細胞を破壊することが形態学的に確かめられている<sup>21)</sup>が、酸素濃度の低下によってNK細胞内でのパーフォリンの産生が障害され、NK活性が低下する可能性も考えられる。

第三に、細胞傷害活性を得るためのエネルギー代謝に酸素が必要であることなどが考えられる。

以上、その詳細なメカニズムはなお不明であるが、酸素濃度の低下がリンパ球のLAK活性、NK活性の低下と抗腫瘍効果の減弱を招くことを明らかにした。この成績は、酸素療法との併用による末梢組織中の酸素濃度(30~60 mmHg)<sup>5),22)</sup>を大気中の酸素濃度(150 mmHg)に近づけることによって、養子免疫療法の効果を高めうる可能性を示唆するものである。

## 結 論

著者は養子免疫療法の効果に影響を及ぼす因子として酸素濃度に注目し、末梢リンパ球のLAK活性、NK活性ならびに肝癌細胞に対する非特異的抗腫瘍活性に及ぼす酸素濃度の影響について検討した結果、以下のごとき結論を得た。

1) 生体内酸素濃度(動脈血:5%,静脈血:2%)下でのIL-2によるリンパ球のLAK活性、NK活性の誘導は、20%酸素濃度下に比べ明らかに低下した。一方、20%酸素濃度下でIL-2刺激によって一旦高い活性を得たLAK細胞、NK細胞による腫瘍細胞の傷害性は生体内酸素濃度下に移しても影響を受けなかった。

2) 生体内酸素濃度下でLAK活性, NK活性が十分に誘導されなかった原因については, リンパ球数, NK細胞数, リンパ球表面上のIL-2R $\beta$ 鎖の発現が20%酸素濃度下と変わらなかったことから, 少なくとも細胞数の減少やIL-2レセプターの発現の低下によるものではないと考えられた。

3) 20%酸素濃度下でIL-2によってリンパ球のLAK活性, NK活性を誘導した後, さらに20%酸素濃度下でIL-2にて再刺激したリンパ球はその後, 高いLAK活性, NK活性を維持したのに対し, 生体内酸素濃度下でIL-2にて再刺激したリンパ球は急速にLAK活性, NK活性を失った。

4) リンパ球の肝癌細胞に対する非特異的抗腫瘍活性の誘導は, 20%酸素濃度下に比べ, 生体内酸素濃度下では低下していた。

5) 低酸素濃度下では20%酸素濃度下に比べ, リンパ球のLAK活性, NK活性, 非特異的抗腫瘍活性の誘導は不十分で一旦誘導された活性は維持されにくかった。以上これらの事実は, 酸素療法の併用により末梢組織中の酸素分圧を上げれば, リンパ球の抗腫瘍活性を高め養子免疫療法の効果を増強しうる可能性を示唆するものである。

稿を終るにあたり, 御指導, 御校閲を賜った辻井 正教授に深甚なる謝意を捧げるとともに, 御校閲, 御助言を賜りました中野 博教授並びに成田亘啓教授に深謝いたします。更に直接, 御指導いただきました石坂重昭講師に感謝するとともに, 御助言いただきました福井 博助教授に感謝します。また, 終始, 御協力いただきました第3内科学教室の諸兄に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Chang, A. E., Avis, F.P., Leitman, S., Laneman, W. M., Robertson, C. N., Lee, R. E., Rubin, J. T., Seipp, C. A., Simpson, C. G. and White, D. E. : *N. Engl. J. Med.* 316 : 889, 1987.
- 2) West, W. H. : *Adoptive cellular immunotherapy of cancer.* Immunology series vol. 48, Marcel Dekker, Inc., New York • Basel, p 79, 1989.
- 3) Blacklock, J. B. and Grimm, E. A. : *Adoptive cellular immunotherapy of cancer.* Immunology series vol. 48, Marcel Dekker, Inc., New York • Basel, p 93, 1989.
- 4) Ghosh, A. K., Dazzi, H., Thatcher, N. and Moore, M. : *Int. J. Cancer* 43 : 410, 1989.
- 5) Pierre, D. : *Principle of comparative respiratory physiology.* Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam • New York • Oxford, 1981.
- 6) 辻 公美 : 免疫実験操作法 I, (日本免疫学会編). p 265, 1971.
- 7) Gwatkin, R. B. L. and Thomn, J. L. : *Nature* 201 : 1242, 1964.
- 8) Stewart, C. C. and Ingram, M. : *Blood* 29 : 628, 1967.
- 9) Goodman, H. S. : *Nature* 190 : 269, 1961.
- 10) Howell, D. N., Andreotti, P. E., Dawson, J. R. and Cressell, P. : *J. Immunol.* 134 : 971, 1985.
- 11) Tsudo, M., Kitamura, F. and Miyasawa, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 : 1982, 1989.
- 12) Pace, D. M., Thompson, J. R. and Camp, W. A. V. : *J. Nat. Cancer Inst.* 28 : 897, 1962.
- 13) Taylor, W. G., Richter, A., Evans, V. J. and Sanford, K. K. : *Exp. Cell Res.* 86 : 152, 1974.
- 14) Balin, A. K., Goodman, D. B. P., Rasmussen, H. and Cristoflo, V. J. : *J. Cell. Physiol.* 89 : 235, 1976.
- 15) Lanier, L. L., Le, A. M., Philips, J. H., Warner, N. L. and Babcock, G. F. : *J. Immunol.* 131 : 1789, 1983.
- 16) Tsudo, M., Goldman, C. K., Bongiovanni, K. F., Chan, W. C., Winton, E. F., Yagita, M., Grimm, E. A. and Waldmann, T. A. : *Proc. Nalt. Acad. Sci.* 84 : 5394, 1987.
- 17) Phillips, J. H., Takesita, T., Sugamura, K. and Lanier, L. L. : *J. Exp. Med.* 170 : 291, 1989.
- 18) Young, J. D. and Cohn, Z. A. : *Adv. Immunol.* 41 : 269, 1987.
- 19) Duwe, A. K., Werkmeister, J., Roder, J. C., Lauzon, R. and Payne, U. : *J. Immunol.* 134 : 2637, 1985.
- 20) Suthanthiran, M., Solomon, S. D., Williams, P. S., Rubin, A. L., Novogrodsky, A. and Stenzel, K. H. : *Nature* 307 : 276, 1984.
- 21) Trinchieri, G. : *Adv. Immunol.* 47 : 187, 1989.
- 22) David, R. K., Thomas, K. H., Heinz, S., Betty, J. H., Zena, W. and Michael, J.B. : *Science* 221 : 1283, 1983.