

Gas permeable bag culture system による lymphokine activated killer 細胞の 長期大量誘導に関する基礎的検討

東京医科大学内科学教室 (指導: 芦澤真六)

石田久人 横井正人 佐藤壽志子 比佐哲哉
桜林 忍 吉益 均 斎藤利彦 芦澤真六

Long Term Incubation of Lymphokine Activated Killer Cells Using Gas Permeable Bag Culture System

Hisato ISHIDA, Masato YOKOI, Toshiko SATO, Tetsuya HISA,
Shinobu SAKURABAYASHI, Hitoshi YOSHIMASU,
Toshihiko SAITO and Shinroku ASHIZAWA

Department of Internal Medicine, Tokyo Medical College
(Director: Prof. Shinroku ASHIZAWA)

Lymphokine activated killer (LAK) cells were inducted using gas permeable bag culture system (SteriCell, Du-Pont, NCC910/911) and roller bottle culture system (Falcon 3027).

Comparison was made for cell number and LAK & NK activities between the gas permeable bag culture system and the roller bottle culture system.

Comparison was also made between the serum free medium (GIT, Nihon seiyaku K.K. & MEM-I, Gibco) and the serum containing medium (5% AB serum containing RPMI1640).

In roller bottle culture system, the cell number was not increased and the values of LAK & NK activities were not elevated. Furthermore, contamination occurred in this system after the 14th day of incubation.

On the other hand, gas permeable bag culture system was useful for long-term incubation of LAK cells. The cell number was 3.5 times increased without medium change and re-addition of interleukin-2. The values of LAK & NK activity increased at the 4th day and re-elevation of LAK & NK activity was seen at the 25th day.

Serum-free medium (GIT) was as useful as the serum containing one. However, using MEM-I (serum free medium), LAK & NK activities were not elevated and cell number was not increased.

There was a decrease in LAK & NK activities gradually after incubation. Effects of the addition of interferon- β (IFN- β) or interleukin-2 on LAK & NK activities were then studied.

By addition of IFN- β (0.125 IU/ml, BM 532, Toray. K.K.) at the 28th day, LAK activities were

(1990年1月30日受付, 1990年2月15日受理)

Key words: リンホカイン活性化キラー細胞 (Lymphokine activated killer cell), 養子免疫療法 (adoptive immunotherapy), ガス透過性バッグ培養シテム (gas permeable bag culture system), インターロイキン2 (interleukin-2), インターフェロン β (interferon- β)

re-elevated after 48hrs.

It is concluded that gas permeable bag culture system was useful for the long term incubation of LAK cell. A large number of LAK cells with high LAK activities were inducted using serum-free medium as well as serum containing one. LAK activities were decreased gradually, but they were re-elevated by IFN- β addition.

I. 緒 言

Morgan¹⁾らによる interleukin-2 (IL-2) である T 細胞増殖因子 (TCGF) の発見および、その遺伝子配列の決定と DNA 組換え大腸菌を用いた recombinant IL-2 の大量生産が可能となって以来²⁾ IL-2 が癌治療の面で注目されている。Grimm ら³⁾ は末梢血リンパ球を IL-2 存在下で培養し、lymphokine activated killer (LAK) 細胞の誘導に成功し、この LAK 細胞を用いた癌の養子免疫療法が多くの施設で行われるようになってきている。

Rosenberg ら⁴⁾ は 157 例の癌患者に、LAK 療法を施行し良好な治療成績を報告している。

われわれは末期消化器癌患者に対して、LAK 細胞および IL-2 併用投与療法 (LAK, IL-2 療法) を 22 例に施行し、complete response 2 例、partial response 2 例の治療成績を得ている⁵⁾⁶⁾。

LAK, IL-2 療法において良好な治療成績を得るためには、高活性で大量の LAK 細胞が必要と考えられている⁷⁾。

LAK 細胞の大量誘導法は Nii⁸⁾, Muul ら⁹⁾ の報告があり、われわれもその方法に準じているが、患者からの頻回な採血および細胞の処理に対する負担が膨大なものとなっている。そこで LAK 細胞の大量誘導を目的として、gas permeable bag culture system (以下 SteriCell, NCC 910/920 Du-Pont) による LAK 細胞の長期誘導を試み、細胞数、LAK 活性、NK 活性について、従来の roller bottle culture system (Falcon 3027, 以下 roller bottle) と比較検討するとともに、培養液についても無血清培地を用い、従来の血清添加培地と比較検討した。

II. 対 象

健常者 5 例、担癌患者 6 例の計 11 例である。なお担癌患者の内訳は肝癌 4 例、胆嚢癌、舌癌各 1 例である。

III. 方 法

1. リンパ球の調整

対象者より cell separator (Haemonetics V 50) を用い末梢単核球を採取し、Ficoll-Conray により遠心分離 (1000 g, 30 min.) したものを lymphocyte とした。これを生理食塩水で 3 回洗浄し、 2×10^6 /ml の濃度になるよう培養液に浮遊した。

2. 培養液

培養液は無血清培地として GIT (日本製薬株式会社) および Opti-MEM I (Gibco 以下 MEM-I) を用い、5% 非動化 AB 血清添加 RPMI-1640 (以下 RPMI) と比較検討した。

なお培養液にはあらかじめ Penicillin (100 μ g/ml), Streptomycin (100 u/ml), Fungizone (10 μ g/ml) を添加したものをを用いた。

3. Recombinant interleukin-2

recombinant IL-2 (TGP-3, 武田薬品, 比活性 4.2×10^4 U/mg protein) は 10 u/ml の濃度で添加した。

4. Culture system

SteriCell および roller bottle を用い 37°C 5% CO₂ 下で培養し、LAK 細胞を誘導した。SteriCell はトレイに静置し、roller bottle は bottle-roller で回転させながら培養した (Fig. 1)。

5. 細胞数

細胞数は検体の一部を採取し経時的に測定した。

6. LAK 活性, NK 活性の測定

LAK 活性, NK 活性の測定はそれぞれ Daudi-cell, K-562 cell を標的細胞とした, 4 hrs⁵¹Cr releasing assay を行い、次式より % cytotoxicity を算出した。

% cytotoxicity =

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

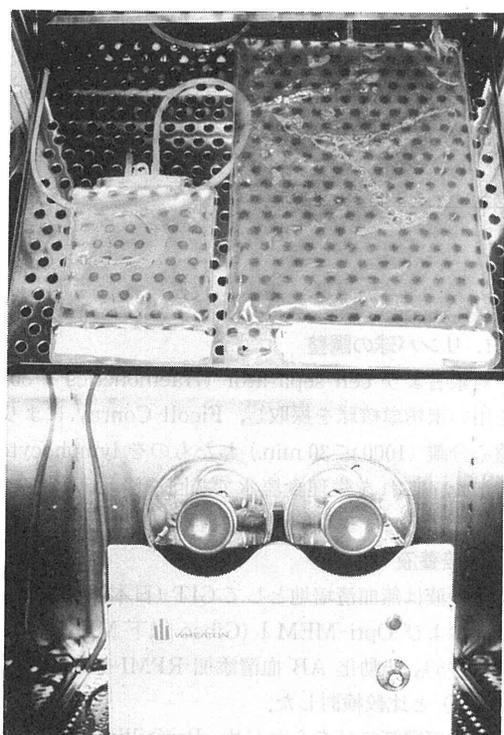


Fig. 1 Gas permeable bag culture system (upper) and Roller bottle culture system (lower)

なお effector/target cell ratio は 40 : 1 であり、経時的に活性を測定した。

7. Interferon- β (IFN- β)

IFN- β (BM 532, 東レ) は活性上昇の目的で培養後期に添加した。

8. 統計学的処理

細胞数, LAK 活性, NK 活性は Mean \pm S.D. で表し, 有意差検定は Student's t test により, 危険率 0.05 以下の場合を有意とした。

IV. 結 果

SteriCell 群においては, 30 日間培養可能であったが, roller bottle 群においては 14 日以降, 2 検体で contamination が認められたため, 14 日以降の培養は行っていない。

1. 細胞濃度の経時的変化

① SteriCell 群

培養液 GIT 及び血清添加 RPMI では培養初期に細胞数の減少が見られるものの 11 日以降は有意に

増加を認め 21 日目に最大となった。

最大細胞濃度は培養開始時と比較すると GIT で平均 2.5 倍, 最大 3.5 倍, 血清添加 RPMI で平均 2 倍, 最大 2.5 倍であった。MEM-I では観察期間中細胞数は有意に減少し, 増加はみられなかった。

② Roller bottle 群

培養液 GIT 及び血清添加 RPMI で 7 日以降, 細胞数は増加傾向を認めたが, MEM-I では逆に有意に減少していた (Fig. 2)。

2. LAK, NK 活性の経時的変化

① SteriCell 群

培養液 GIT 及び血清添加 RPMI では, LAK 活性, NK 活性は 4 日目に高活性を示し, 培養開始時に比し有意に活性の上昇を認めた。

4 日以降, 活性は低下傾向を示したが, 21 日目から 25 日目にかけて培養開始時に比し有意に活性の再上昇が認められた。しかし MEM-I においては観察期間中, 有意な活性の上昇は認められなかった。

② Roller bottle 群

Roller bottle 群では各培養液において LAK 活性, NK 活性に有意差は認められなかった (Fig. 3)。

3. IFN- β 添加, IL-2 再添加

SteriCell の長期誘導では LAK 活性, NK 活性の高活性を維持できず, 経過とともに低下する傾向を示した。そこで活性の上昇を目的として培養後期の 28 日目に IL-2 または IFN- β をそれぞれ 10 U/ml, 0.125 IU/ml の濃度で添加し 48 時間後に細胞数, LAK 活性, NK 活性を測定した。

細胞数, NK 活性は IL-2, IFN- β の添加で有意な増加は認められなかったが, LAK 活性は IFN- β 添加群で有意な上昇を認めた (Fig. 4)。

V. 考 察

従来 Rosenbergr¹⁰⁾ による 3~4 日間の短期間の LAK 細胞の誘導法では, 培養開始時と比較すると細胞数の減少が認められる。したがって治療に十分な LAK 細胞を得るためには患者からの頻回な採血及び, それに伴う細胞の処理に, 膨大な負担が余儀無くされる。そこで, LAK 細胞を簡便にかつ, 高活性で大量に誘導する方法が望まれている¹¹⁾。

今回従来 roller bottle で LAK 細胞の長期誘導

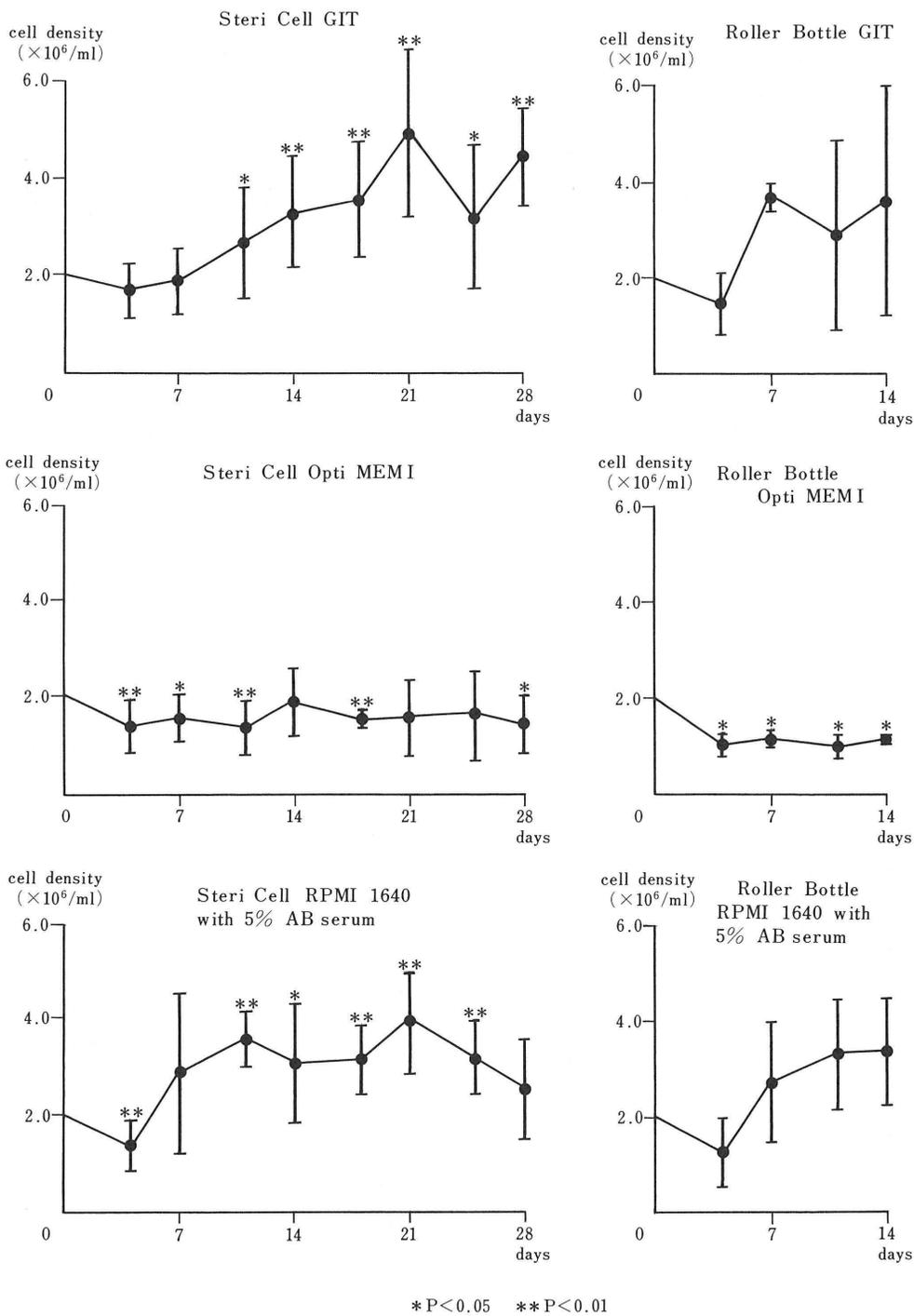


Fig. 2 Serial observation of LAK cell density

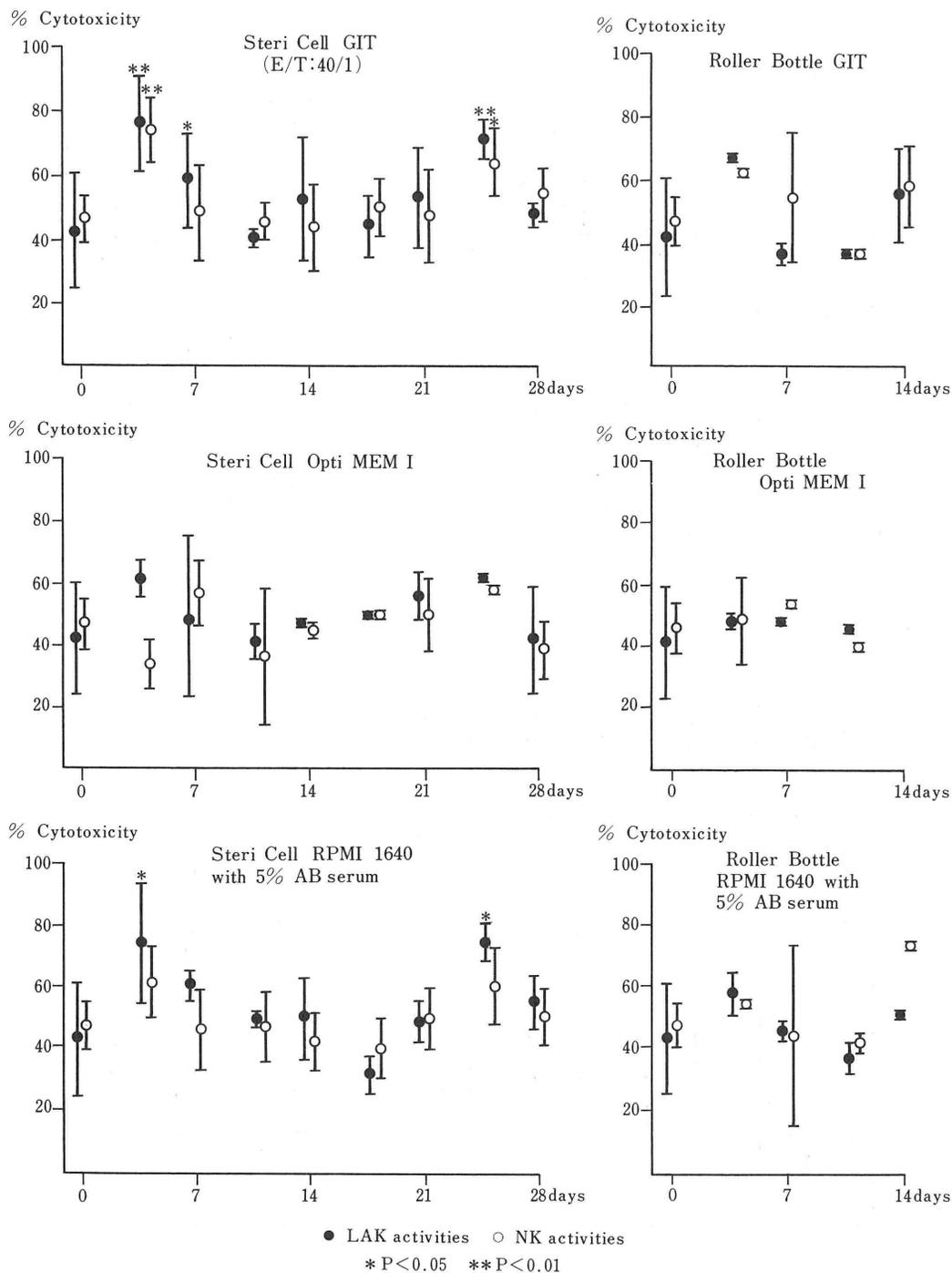


Fig. 3 Serial observation of LAK and NK activities

を試みたところ、contamination を認め、14 日間以上の培養は困難であった。contamination は実験のための頻回な検体採取が原因と思われる。

また roller bottle 群で細胞数、LAK 活性、NK 活性は培養開始時に比し、有意な上昇はみられなかった。

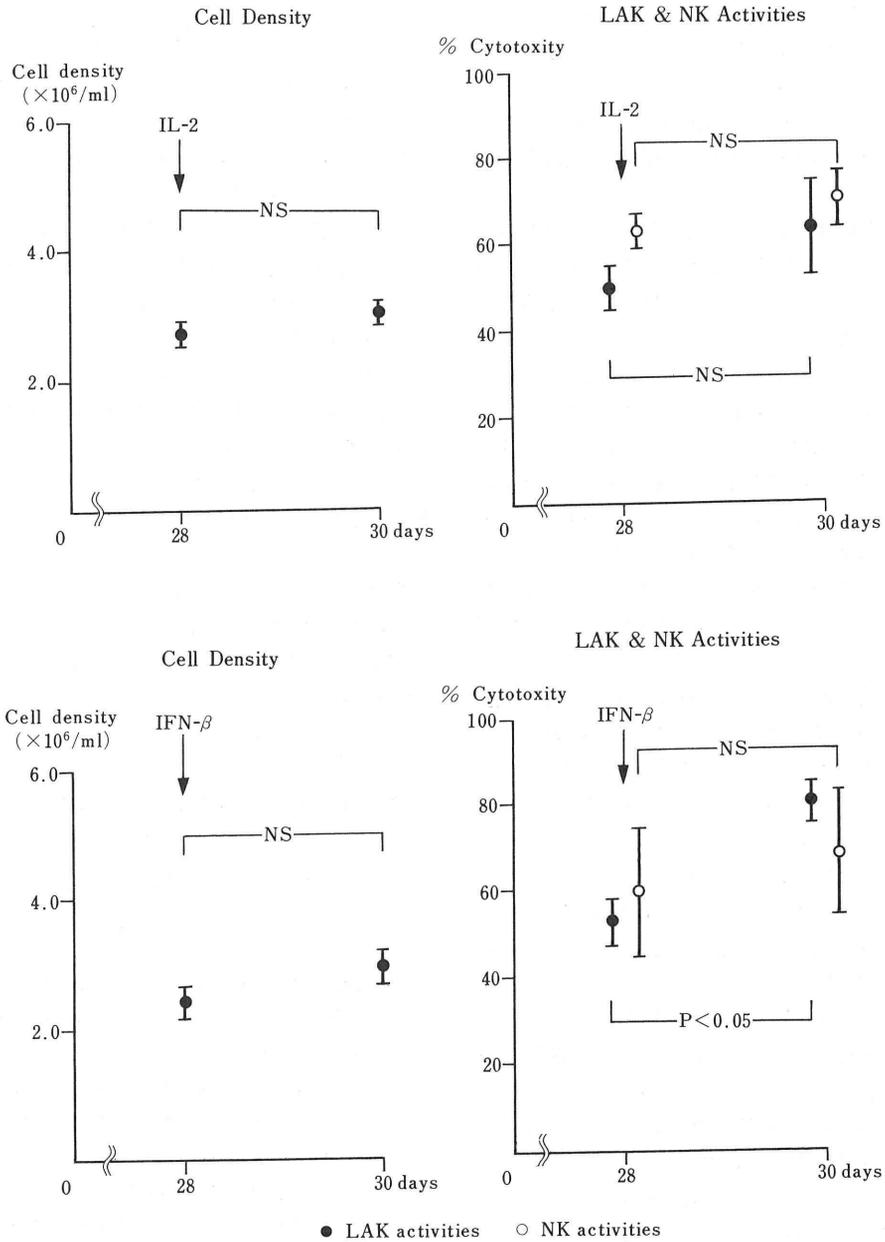


Fig. 4 Effects of IL-2 or IFN-β addition

しかし SteriCell は通気性を有するフィルムで構成される閉鎖回路のため、頻回な実験操作を加えたにもかかわらず、contamination は培養期間中まったく認められず、30 日間の培養が可能である。

細胞数も培養液の交換ならびに IL-2 の再添加なしでも 21 日目で最大約 3.5 倍の増加を認め、SteriCell による長期間の LAK 細胞の誘導は LAK,

IL-2 療法において有用と思われる。

LAK 細胞の大量誘導に際して培養液に添加する血清に関して Froelich ら¹²⁾ の報告では LAK 活性は血清濃度に依存するとしていたが、今回われわれの実験では無血清培地である GIT で、細胞数のみならず LAK 活性についても 5% AB 血清添加 RPMI-1640 と同様に良好な成績が得られた。

ヒト AB 型血清は高価でかつ入手困難であり LAK 細胞の大量誘導に際してコストの面で負担となっている。しかし無血清培地においても血清添加培地と同様に、高活性の LAK 細胞が誘導することができ、長期大量誘導に関して無血清培地は有用と思われる。

Steri Cell-GIT および血清添加 RPMI においては、LAK 活性、NK 活性は培養開始後 4 日目に高活性を示しその後は低下傾向を認めた。ところが培養後期の 21～25 日目にかけて活性の再上昇が認められた。培養液の交換および IL-2 の再添加なしでも活性の再上昇が認められたことは興味深い。

成松ら¹³⁾¹⁴⁾の報告によると IL-2 培養リンパ球の増殖に関して休止期にある T 細胞は IL-2 receptor を発現していないとしている。今回の実験では、活性の再上昇の機序については詳しい検討はなされていないが、細胞分裂周期による影響などが推測された。今後さらに活性の再上昇の機序についての検討が必要と思われる。

培養の経過で活性は低下する傾向を示した。培養後期に活性の上昇を目的として IL-2 の再添加または IFN- β を添加したところ IFN- β 添加群でのみ LAK 活性の再上昇が認められ、培養初期の高活性にまで有意に上昇した。

また活性と細胞数につき検討してみるとそれぞれのピークの時期が異なっており、LAK、IL-2 療法における LAK 細胞の培養期間および、LAK 細胞の投与時期が問題となっている。しかし IFN- β の添加で活性の再上昇が得られたことは、今後の LAK、IL-2 療法の治療計画において、高活性大量の LAK 細胞を得ることができ有用と思われる。

IFN- β は単独で抗腫瘍効果が認められているが、免疫学的パラメーターへの影響には、マクロファージの活性化や NK 活性の上昇が報告されている¹³⁾。今回の実験では LAK 活性のみ再上昇をみとめたが今後 IFN- β による IL-2 receptor の発現など LAK 細胞誘導に及ぼす影響についてさらに検討が必要と思われる。

細胞数のさらなる増加、および高活性の維持について、培養液の交換、抗 CD3 抗体の添加による細胞数の増加例などの報告^{16)~19)}もみられ、有用な方法と思われる。

VI. 結 語

1. SteriCell および roller bottle で LAK 細胞の長期培養を試みた。

2. SteriCell は contamination が認められず、培養スペースも小さく長期培養に有用であった。

3. SteriCell による LAK 細胞の長期培養で細胞数は培養液の交換ならびに、IL-2 の再添加することなく、最大約 3.5 倍に増加した。またそのピークは 21 日目であった。

4. 無血清培地においても血清添加培地同様に高活性大量の LAK 細胞の誘導が可能である。

5. LAK 活性、NK 活性は培養 4 日目に高活性を示し、その後は低下傾向を示した。また、SteriCell による長期培養で 25 日目に活性の再上昇を認めた。

6. 培養後期に IFN- β を添加することにより LAK 活性は初期の高活性を示した。

以上より、SteriCell による LAK 細胞の長期間誘導は LAK、IL-2 療法における有効な培養法であることが示唆された。

この研究の一部は昭和 63 年度東京医科大学研究助成金によった。またこの要旨は第 17 回日本臨床免疫学会総会（広島）で発表した。

文 献

- 1) Mogan, D.A., et al: Selective *in vitro* growth of lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*, **193**: 1007~1008, 1976
- 2) Taniguchi, T., et al: Structure and expression of a cloned c-DNA for human interleukin-2. *Nature*, **302**: 305~310, 1983
- 3) Grimm, E.A., et al: Lymphokine activated killer phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cell by interleukin-2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **155**: 1823~1841, 1982
- 4) Rosenberg, S.A., et al: A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.*, **316**: 889~897, 1987
- 5) 吉益 均ら, : 肝癌に対する LAK (Lymphokine

- Activated Killer) cell と Interleukin-2 (IL-2) 投与療法の臨床的検討. 肝臓, **29**: 192, 1988
- 6) Yoshimasu, H., et al: Clinical investigation on the administration of autologous lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with liver cancer. *Hepatology*, **8**(5): 1447, 1988
 - 7) Rosenberg, S.A.: Adoptive immunotherapy of cancer: Accomplishments and prospects. *Cancer Treat. Resp.*, **68**: 233~255, 1984
 - 8) Nii, A., Sone, S., et al: Lymphokine-activated killer adoptiveimmunotherapy. Optimal method for large scale LAK induction. *Jpn. J. Cancer Chemother*, **14**(6): 1871~1876, 1987
 - 9) Muul, L.M., et al: Large scale production of human lymphokine activated killer cells for use in adoptive immunotherapy. *Journal of Immunological Methods*, **88**: 265~275, 1986
 - 10) Rosenberg, S.A.: Adoptive immunotherapy of cancer using lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2. *Important Adv. Oncol.*, 55~91, 1986
 - 11) Muul, L.M., et al: Development of an automated closed system for generation of human lymphokine activated killer cells for use in adoptive immunotherapy. *Journal of Immunological Methods*, **101**: 171~181, 1987
 - 12) Froelich, C.J. and Guiffaut, S.: Induction of lymphokine activated killer cells in serum-free medium. *Journal of Immunological Methods*, **86**: 205~211, 1986
 - 13) 成松 久: T 細胞増殖因子 (TCGF) とその応用— T 細胞株による免疫応答の解析—. *代謝*, **17**: 2069~2077, 1980
 - 14) 成松 久, 斎藤和久: IL2 (TCGF) による腫瘍特異的 T 細胞の培養とその臨床治療への応用. *免疫と疾患*, **5**: 85~93, 1983
 - 15) 永井政勝, 新井紀元: 悪性脳腫瘍に対するインターフェロン治療の現状と将来. *脳神経外科*, **10**: 463~476, 1982
 - 16) Ochoa, A.C., et al: Long-term culture of LAK cells.: Expansion and activation signals. *Cellular Immunotherapy of Cancer*, **244**: 289~299, 1987
 - 17) Ochoa, A. C., et al: Long-term growth of lymphokine activated killer cells.: Role of anti-CD3, β -IL1, interferon- γ and $-\beta$. *The Journal of Immunology*, **138**: 2728~2733, 1987
 - 18) Mingari, M.C., et al: Phenotypic and functional analysis of human CD3+ and CD3- clones. "lymphokine-activated killer" activity. Frequent occurrence of CD3+ LAK clones which produce interleukin-2. *Int. J. Cancer*, **40**: 495~498, 1987
 - 19) Ochoa, A.C., et al: Lymphokine-activated killer activity in long-term cultures with anti-CD3 plus interleukin-2: Identification and isolation of effector subsets. *Cancer Reserch*, **49**: 963~968, 1989
- (別刷請求先: 〒160 新宿区西新宿 6-7-1
東京医科大学内科学教室 石田久人)