



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	活性化リンパ球を用いた犬の腫瘍免疫療法の臨床応用に関する基礎的研究
Author(s)	星野, 有希
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第8786号
Issue Date	2008-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k8786
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/36614
Type	doctoral thesis
File Information	hoshino.pdf



活性化リンパ球を用いた犬の腫瘍免疫療法の
臨床応用に関する基礎的研究

星野 有希

略 語 表

ACL : Activated lymphocyte	活性化リンパ球
APC : Antigen presenting cell	抗原提示細胞
CD : Cluster of differentiation	分化抗原群
cDNA : complementary deoxyribonucleic acid	相補的デオキシリボ核酸
Ct : Threshold cycle	Ct 値
CTL : Cytotoxic T cell	細胞傷害性 T 細胞
DC : Dendritic cell	樹状細胞
DIG : Digoxigenin	ジゴキシゲニン
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫吸着測定法
FBS : Fetal bovine serum	牛胎児血清
FITC : Fluorescein isothiocyanate	フルオレセインイソチオシアネート
GAPDH : Glycerinaldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	グリセルアルデヒド三リン酸 脱水素酵素
IFN : Interferon	インターフェロン
IL : Interleukin	インターロイキン
hr : Human recombinant	ヒトリコンビナント
hT : Helper T	ヘルパー T
MHC : Major histocompatibility complex	主要組織適合性抗原複合体
mRNA : messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
NK : Natural killer	ナチュラルキラー
NKT : Natural killer T	ナチュラルキラー T
PB : Phosphate buffer	リン酸緩衝液
PBMC : Peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核球
PBS : Phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
PCR : Polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PE : Phycoerythrin	フィコエリスリン
PFA : Paraformaldehyde	パラホルムアルデヒド
PHA : Phytohemagglutinin	フィトヘマグルチニン
RBA : Rose Bengal Assay	ローズベンガルアッセイ
QOL : Quality of life	生活の質

目 次

緒 言	1
第 1 章 犬 CD56 mRNA の相対定量法と正常組織およびリンパ球における CD56 発現様式	5
1. 序	5
2. 材料および方法	6
1) 犬の正常組織	6
2) PBMC の採取	6
3) PBMC の培養および回収	6
4) PHA による刺激培養	7
5) RNA の抽出	7
6) 逆転写 PCR 法	7
7) 定量 PCR 法	8
8) <i>In situ</i> ハイブリダイゼーション	9
(1) RNA プロブの作成	9
(2) サンプルの準備	9
(3) <i>In situ</i> ハイブリダイゼーション	9
9) 統計学的解析法	10
3. 結 果	11
1) CD56 の検量線	11
2) PCR 法による犬正常組織における CD56 mRNA の発現	11
(1) 逆転写 PCR 法	11
(2) 定量 PCR 法	11
3) PBMC の増殖率	11
4) PBMC および ACL の CD56 mRNA の相対定量	11
5) PHA 刺激前後の CD56 mRNA の相対定量	12
6) PBMC および ACL における CD56 mRNA の局在	12
4. 考 察	19
5. 要 旨	21
第 2 章 健常犬における培養活性化リンパ球の性状およびその繰り返し投与による健常犬の免疫動態への影響	22

1. 序	22
2. 材料および方法	23
1) ... PBMC の採取および刺激培養法	23
2) ... PBMC および ACL を構成する細胞の表面抗原解析	23
3) 細胞傷害性試験	23
(1) ... 腫瘍細胞の培養	23
(2) ... ローズベンガルアッセイ	24
(3) ... 形態学的観察	24
4) CD56 mRNA 発現量の相対定量	24
5) IFN- γ 濃度の測定	25
6) 健常犬に対する ACL の繰り返し投与	25
7) ... 統計学的解析法	25
3. 結 果	26
1) ACL の細胞数	26
2) PBMC および ACL の表面抗原の解析による 構成細胞比の変化	26
3) 細胞傷害率の変化	26
4) 形態学的観察	26
5) CD56 mRNA 発現量の変化	27
6) ... 健常犬に対する ACL の繰り返し投与の影響	27
(1) ... 細胞数	27
(2) ... 構成細胞比の変化	27
(3) ... CD56 mRNA 発現量の変化	27
(4) ... ACL の IFN- γ 産生量	27
(5) ... ACL を繰り返し投与した際の免疫動態の変化	28
4. 考 察	40
5. 要 旨	43
第 3 章 活性化リンパ球療法を実施した腫瘍罹患犬 10 症例	44
1. 序	44
2. 材料および方法	45
1) 症 例	45
2) ACL の培養および投与法	45

3)	活性化リンパ球療法の評価項目	45
(1)・	PBMC の増殖活性	45
(2)・	PBMC および ACL の細胞傷害率	45
(3)・	PBMC および ACL を構成する細胞の表面抗原解析	45
(4)	PBMC および ACL の CD56 mRNA 発現量の 相対定量	45
(5)・	血清 IFN- γ 濃度の測定	46
(6)・	副作用の有無、経過および飼い主の印象	46
3.	結 果	49
1)	細胞増殖率	49
2)	PBMC および ACL の非特異的な細胞傷害率の変化	49
3)	構成細胞比の変化	49
4)....	CD56 mRNA 発現量の変化	50
5)....	血清 IFN- γ 濃度の変化	50
6)	副作用の有無、経過および飼い主の印象	50
7)	腫瘍の種類による経過	51
4.	考 察	62
5.	要 旨	65
総 括		66
引用文献		69
謝 辞		76
英文抄録		77

緒 言

近年、小動物においても食餌の質や飼育環境の向上などによる寿命の延長に伴い、腫瘍疾患の発生が著しく増加している（Craig、2001）。従来からの腫瘍に対する治療法である外科手術、化学療法および放射線療法（Blackwood と Dobson、1996）は一定の効果がある一方で侵襲も大きいため、状態によっては生活の質（QOL；Quality of life）を維持することが重要視される小動物の治療法として必ずしも適切とはいえない場合がある。そこで腫瘍に対する副作用の少ない第4の治療法として免疫療法の応用が注目されているが、小動物において最適な方法は未だに確立されていない。

腫瘍免疫の概要を図1に示した。腫瘍細胞の増殖に伴って局所に惹起された炎症反応に誘導され、まず樹状細胞（DC；Dendritic cell）が抗原提示細胞（APC；Antigen presenting cell）として動員される。DCは腫瘍抗原を取り込み、リンパ臓器に移行してTリンパ球に抗原を提示する。提示を受けて感作された細胞傷害性T細胞（CTL；Cytotoxic T lymphocyte）は、リンパ臓器を離れ腫瘍局所へ動員されることにより特異的な抗腫瘍免疫が成立する。

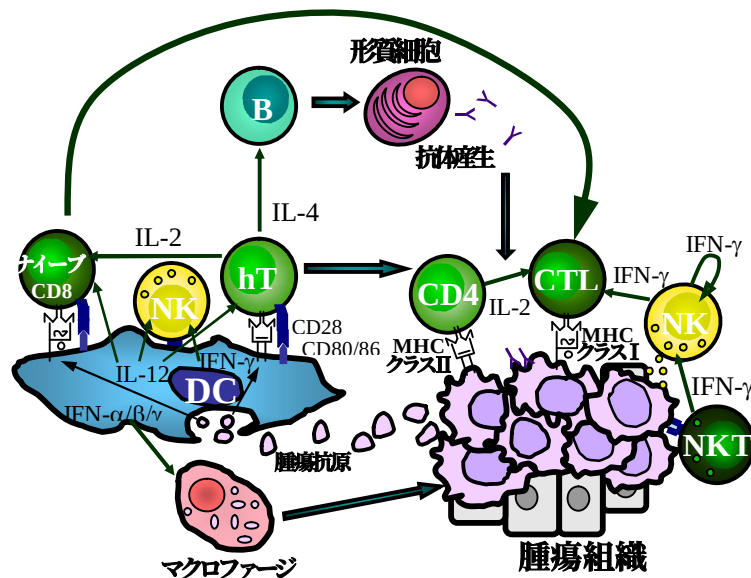


図1. 免疫反応の成り立ち

DCは腫瘍抗原を取り込み、リンパ臓器に移行してTリンパ球に抗原を提示する。提示を受けて感作されたナイーブCD8リンパ球はCTLとなりリンパ臓器を離れ、腫瘍局所へ動員される。CTLは、APCにより活性化されたhT細胞から分泌されるIL-2やCTLやNK細胞などから分泌されるIFN- γ の供給を受けて増殖し、腫瘍細胞表面のMHCクラスI分子内に提示された腫瘍抗原ペプチドを認識して腫瘍細胞を傷害する。また、リンパ球にはMHCを認識せずに腫瘍細胞を非特異的に傷害することのできるNK細胞およびT細胞とNK細胞の両方の性質を併せ持つNKT細胞なども存在する。他にも様々な細胞やサイトカインの複雑な共同作業によって免疫機構は形成されている。

CTLと共に活性化されたヘルパーT (hT) 細胞は、インターロイキン (IL ; Interleukin) -2等のサイトカインを産生しCTLの増殖を促進するとともにAPCを活性化する。CTLは腫瘍細胞の主要組織適合性抗原 (MHC ; Major histocompatibility complex) クラス I に提示されている腫瘍抗原ペプチドを認識し、腫瘍細胞を傷害する (Callanら、2000 ; Wangら、2000)。hT細胞自身はMHCクラスIIに提示されている腫瘍抗原を認識して腫瘍細胞を傷害し、さらにIL-2を産生する。またhT細胞は、IL-4やIL-6などを産生してB細胞を形質細胞へと分化させ、抗腫瘍抗体を産生させる。以上のような機序により腫瘍抗原特異免疫反応が生じている。またリンパ球には、MHCを認識せずに腫瘍細胞を非特異的に傷害することのできるナチュラルキラー (NK ; Natural killer) 細胞と、T細胞とNK細胞の両方の性質を併せ持つナチュラルキラーT (NKT) 細胞なども存在する (FaragとCaligiuri、2006)。NK細胞はMHCクラス I の発現が低下した腫瘍細胞によって活性化され、インターフェロン (IFN ; Interferon) - γ の産生を促進してCTLを活性化し、また細胞傷害顆粒を放出することにより抗原非依存性に腫瘍細胞を傷害する。腫瘍細胞には正常細胞より MHC の発現が低い細胞が多く、そのような細胞はCTLの標的になりにくいかわりにNK細胞のよい標的になり得る (Mocikatら、2003 ; 反町ら、2001 ; YokoyamaとSeaman、1993)。他にも様々な細胞やIL-4、-6、-12、IFN- α 、- β および - γ 等のサイトカインの複雑な共同作業によって免疫機構は形成されている。生体はこのように、相補的な抗腫瘍機能を本来有している。

しかし、腫瘍という特殊な新生物や担がん状態という特別な病態によって抗腫瘍免疫が様々な機構で抑制されることがわかってきた (Tada ら、1990 ; Yamamoto ら、1995 ; Zou ら、1992)。担がん状態では特に T 細胞機能が全般的に低下するが、この T 細胞抑制は不可逆的なものではなく、原発腫瘍を早期に除去することにより、抑制されていた T 細胞機能が回復することが知られている (Nagata ら、1993 ; Salvadori ら、2000 ; Zou ら、1994)。しかし、一般的に小動物においては腫瘍がかなり進行した後、初めて診断される場合が多く、しかも悪性度の高い腫瘍は進行速度の早いものも多く (Withrow と MacEwen、1989)、病態の悪化に伴い抗腫瘍免疫が減弱する可能性が高い (Ioannides と Whiteside、1993)。そのような担がん状態が持続した症例では原発腫瘍を制御しても容易に免疫機能が回復しないことが推測される。

担がん動物の免疫抑制状態を改善する方法として、近年免疫療法が注目され

ている。ヒト医学で現在研究中および臨床応用されている免疫療法を表 1 に示した（藤原、2003）。表 1 の I、II および

表 1. 腫瘍の免疫療法

III は能動的免疫療法といわれ、体内の T 細胞の機能増強が目的である。代表的なものは I の DC ワクチンで、体外で DC を誘導しワクチンとして投与することで体内における抗腫瘍エフェクター細胞の誘導増強を図る方法である。しかし、がん宿主が強い免疫抑制状態にある場合、これら能動的免疫療法の効果はあまり期待できない。IV および V は受動的免疫療法といわれ、エフェクター細胞を体外で人為的に作製し、それを移入するアプローチである。IV の代表的なものは活性化リンパ球療法である。活性化リンパ球療法は、

I	がん抗原による免疫誘導
	1. がんペプチドワクチン
	2. 樹状細胞 (DC) ワクチン
II	副刺激受容体増強
	1. CTLA-4 分子阻害
	2. CD28 受容体刺激
III	T 細胞に働くサイトカインによる免疫増強
	1. IL-2
	2. IL-12
	3. IFN- α 、 β および γ
IV	活性化エフェクター投与による免疫移入
	1. 活性化リンパ球投与
	2. 腫瘍浸潤リンパ球投与
V	抗腫瘍抗体による免疫療法
VI	Biological response modifier による免疫増強

担がん症例から採取したリンパ球を増殖因子と共に体外で培養して活性化し、当該症例に繰り返し投与して抗腫瘍効果を亢進させる治療法である（Grimm ら、1983）。一般的に腫瘍を退縮させる能力は強くないが、副作用がほとんどないといわれている。活性化リンパ球の誘導法に用いられる増殖因子は施療する医療機関によって様々であり、活性化リンパ球投与による治療法の呼び名もそれに応じて複数ある。現在、抗 Cluster of differentiation (CD) 3 抗体と IL-2 が最も一般的に用いられる増殖因子であり、その場合に得られる細胞は細胞傷害活性の高い CD3⁺ T 細胞や NK 細胞であるといわれている（Grimm、1986；Nishimura ら、1992）。活性化リンパ球療法は、ヒト医学領域では悪性腫瘍に対する一つの免疫療法として臨床応用されており、固形腫瘍を有する患者に対する延命効果（Ebina ら、2003）や肝臓がんにおける術後の再発率の低下（Takayama ら、2000）が統計的に証明されている。V は腫瘍に特異的な抗体を作製し当該症例に投与する方法である。VI は腫瘍細胞に対する宿主の生物学的応答を修飾することにより、治療効果をもたらす物質または方法と定義されている。小動物でも一般的に用いられているサプリメントの投与などがこれにあたる。しかし腫瘍に対する特異性は一般的に弱いといわれている。

小動物では前述のように免疫抑制が重度である可能性が高いため、受動的免

疫療法が適応となる場合が多い。その一つである活性化リンパ球療法は、徐々に臨床応用されはじめているものの、適切な培養法や投与方法などに関する情報や、明確に効果が判定されたとの報告は見当たらない。

以上のような背景から、本論文では活性化リンパ球療法の腫瘍罹患犬に対する適応を検討するため、以下の方法を用いた。まず第 1 章では、ヒトの抗腫瘍免疫において重要とされている NK 細胞に関して、その特異的なマーカーの一つである CD56 の、犬におけるメッセンジャーリボ核酸（mRNA； messenger ribonucleic acid）発現量の定量のために定量ポリメラーゼ連鎖反応（PCR； Polymerase chain reaction）を用いて測定系を確立した。次いで、犬の正常臓器における CD56 発現量とリンパ球におけるそれとを相対定量し、さらに *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて犬の末梢血単核球（PBMC； Peripheral blood mononuclear cell）および刺激培養したリンパ球における CD56 mRNA の局在を調べた。第 2 章では、健常犬の PBMC を抗 CD3 抗体と IL-2 を用いて刺激培養して活性化したリンパ球を誘導してその性状を解析し、正常犬における活性化リンパ球の誘導法について検討した。さらに、その活性化リンパ球を健常犬に繰り返し投与した際の生体反応について調べた。第 3 章では、北海道大学大学院獣医学研究科附属動物病院に来院した腫瘍罹患症例犬に対して活性化リンパ球療法を実施し、その経過を詳細に観察してその有効性について評価した。

なお、すべての動物実験は、「北海道大学獣医学研究科・獣医学部における実験動物に関する指針」に従って実験動物委員会の許可を得て実施した。

第1章 犬 CD56 mRNA の相対定量法と正常組織およびリンパ球における CD56 発現様式

1. 序

神経細胞接着因子として知られている CD56 は神経、筋、NK 細胞および腫瘍細胞に広く発現し (Cohavy と Targan, 2007; Moore ら, 1987; Rutishauser, 1996)、特にヒトにおいては NK 細胞の代表的なマーカーとして用いられている (Takahashi ら, 2006)。

犬では 2005 年に CD56 の塩基配列やその発現臓器がヒトとほぼ同様であることが報告された (Bonkobara ら, 2005) が、その発現細胞の詳細や機能についてはまだ知られていない。犬のリンパ球中には CD56⁺細胞の存在が示唆されている (Otani ら, 2002) が、犬の NK 細胞に CD56 が発現しているか否かはまだ分かっていない。さらに末梢血中での動態も未だ不明であることから、今後犬の NK 細胞を研究するにあたって、CD56 の簡単な測定系を確立してその分布様式を明らかにすることは重要である。

そこで本章では、犬の CD56 mRNA の測定系として比較的簡便な定量 PCR 法を用いた方法を作成し、この測定系を用いて犬の正常組織およびリンパ球における CD56 mRNA 発現量を相対定量するとともに、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて犬の PBMC および刺激培養したリンパ球における CD56 の局在を調べた。

2. 材料および方法

1) 犬の正常組織

過剰量のペントバルビタールナトリウムの静脈内投与による全身麻酔後、塩化カリウム溶液の静脈内投与によって安楽殺した臨床上異常が認められない健常ビーグル成犬雄1頭から大脳皮質、肺、肝臓および腎臓を採取した。組織は5 mm角に細切して組織中のRNAを安定に保つ保存用試薬（RNA later；Ambion、Austin、TX、U.S.A.）に4℃で一晩浸漬した後、使用時まで-80℃で凍結保存した。

2) PBMCの採取

健常ビーグル成犬5頭（雄3頭、雌2頭、月齢18～26か月、体重12～14 kg）から末梢血を採取し、ヘパリン（10 U/ml血液）を加えて抗凝固処理した。等量のリン酸緩衝生理食塩水（PBS；Phosphate-buffered saline）で希釈した後、Ficoll-Paque比重遠心法（Boyum、1968；Kolら、1983）にてPBMCを分離した。

採取したPBMCは、CD56 mRNAの相対的定量的ために 1.0×10^6 個をマイクロチューブに分取し 5,800×g、22℃で1分間遠心して上清を捨て、沈渣をタッピングして使用時まで-20℃で保存した。

3) PBMCの培養および回収

PBMCの培養は、Ebinaら（2001）およびItohら（2003）の方法を併せ、一部改変して以下のように行った。すなわち、ヘパリン加末梢血約20 mlより分離したPBMC 3.0×10^7 個を、RPMI1640+9（IL-2：1,000RU/ml、日研生物医学研究所、京都）、RPMI1640（GIBCO BRL、Gaithersburg、NY、U.S.A.）および牛胎児血清（FBS：Moregate Biotech、Bulimba、Australia）をそれぞれ7：2：1に混合した完全培養液 Complete medium（IL-2：700 RU/ml、10% FBS）10 mlに浮遊させ、抗CD3抗体（1 mg/ml mouse anti canine CD3；Serotec、Oxford、U.K.）25 μlを生理食塩水5mlで希釈し、24時間固着させた75 cm²培養フラスコにて培養を開始し、培養開始日を0日目とした。培養は37℃、5% CO₂条件下で行った。以降、4、8および12日目にトリパンブルー色素排除法（Tennant、1964）によって生細胞を計数した。4日目に Complete medium を5 ml 追加し、

8日目より IL-2 175 RU/ml、2.5% FBS となるように Complete medium と RPMI1640 を 1:3 に混合した培養液を用い、CO₂透過性の培養バッグ (A-350、ニプロ、大阪) にて 14 日目まで培養した。

14 日目に細胞浮遊液を回収、50 ml の遠沈管に分注して 850×g、22°C で 10 分間遠心して上清を吸引除去し、ヒトリコンビナント (hr ; human recombinant) IFN-α (interferon alpha A、PBL Biomedical Laboratories、NZ、U.S.A.) 15U 加 RPMI1640+9 培養液 15 ml に浮遊させ、15 分間 37°C、5% CO₂ で再活性化した。その後 PBS で 2 回洗浄して細胞を計数し、生理食塩水に浮遊させてこれを培養活性化リンパ球 (ACL ; Activated lymphocyte) とした。この培養 14 日目の ACL 1.0×10^6 個をマイクロチューブに分取し、使用時まで -20°C で保存した。

4) フィトヘマグルチニン (PHA) による刺激培養

末梢血より分離したPBMCを 1.0×10^6 個/ml 10% FBS加RPMI1640に調整し、5mlをプラスチックシャーレに分注した。そこにPHA (Invitrogen、Carlsbad、CA、U.S.A.) を終濃度が4%になるように加え、4日間37°C、5% CO₂条件下で培養した。その後回収し、PHA刺激PBMCとして 1.0×10^6 個マイクロチューブに分取し、使用時まで -20°C で保存した。

5) RNAの抽出

組織からの全RNAの抽出はChomczynskiとSacchi (1987) の方法に従って行った。PBMC、PHA刺激PBMCおよびACLからの全RNAの抽出はスピンカラム (RNeasy mini spin column、Qiagen、Les Ulis、France) を用いて説明書に従って行った。その後RNA溶液は、波長260 nmの吸光度を測定して濃度を100 ng/μl に調整した。RNA溶液は使用時まで -80°C で保存した。

6) 逆転写PCR法

抽出した全RNAを鋳型としてランダムヘキサマープライマー (Promega、Madison、WI、U.S.A.) と Molonyマウス白血病ウイルス由来逆転写酵素 (MMLV-RT、Invitrogen) を用いて37°Cで60分間逆転写反応を行い相補的な一本鎖デオキシリボ核酸 (cDNA ; complementary deoxyribonucleic acid) を得た。(Kozasaら、2005)。

CD56のプライマーはヒト (GenBank accession number U63041)、マウス

(accession number NM010875) および犬 (accession number AY860628) のCD56 の塩基配列から高度に保存された領域を標的として設計した。また内部標準遺伝子として犬のglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (accession number AB038240)、を用いた。それぞれの遺伝子におけるプライマー配列は以下の通りである;CD56はヒト遺伝子、GAPDHは犬遺伝子の塩基番号を示す。
CD56センスプライマー; 5'-TGCCGGCATATACAAGTGTGT-3' (299-319)
アンチセンスプライマー; 5'-TGCCCCTGATCTGCAGGTAGT-3' (564-544)
GAPDHセンスプライマー; 5'-GTGCTGAGTATGTTGTGGAG-3' (266-285)
アンチセンスプライマー; 5'-AAGCAGTTGGTGGTGCAGGA-3' (464-445)

得られたcDNA反応液にセンスおよびアンチセンスプライマーと*Taq* DNAポリメラーゼ (ニッポンジーン、富山) を加えてPCRを行った。PCR反応液を変性 (94°C、30秒)、アニーリング (55°C、30秒)、および伸張 (72°C、30秒) の反応条件を35回反復した。得られたPCR産物を2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、紫外線照射下で増幅を確認した。

7) 定量的PCR法

リアルタイム PCR 法による定量的 PCR は、下記の通り行った。犬の正常組織、PBMC、ACL および PHA 刺激 PBMC の CD56 mRNA 発現量は ABI7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems、東京) を用いて相対的に定量した。リアルタイム PCR 反応液には 2 μ l の cDNA 反応液、2.5 pmol のプライマー、12.5 μ l の SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems、Cheshire、U.K.) を混合し、滅菌水で 25 μ l に調節した。反応液を 50°C で 2 分間、95°C で 3 分間変性し、変性 (95°C、30 秒間)、アニーリング (55°C、30 秒間) および伸張 (72°C、1 分間) の条件で 50 回増幅した。

得られた増幅産物を相対的に定量するために脳の CD56 mRNA の PCR 産物を用いて検量線を作成した。すなわち CD56 PCR 産物を MILLIPORE Ultrafree-DA (MILLIPORE、Bedford、MA、U.S.A.) を用いて回収して吸光度を測定し、10 ng/ μ l に調整した。PCR 産物の分子量とアボガドロ係数よりコピー数を算出し、そのコピー数が 7×10^0 から 7×10^{-6} となる階段希釈を行った。この 7 段階希釈溶液をテンプレートとしてリアルタイム PCR を行い、対数増幅期に達したサイクル数 (Threshold cycle; Ct 値) とコピー数から検量線を作成した (Kaetzke ら、2005)。GAPDH に関しても同様に作成した。作成した検

量線を用いて各材料の遺伝子発現量を算出し、CD56/GAPDH を相対発現量とした。

8) *In situ* ハイブリダイゼーション

(1) RNAプローブの作製

Digoxigenin (DIG) 標識RNAプローブは、DIG RNA labeling kit (SP6/T7) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用い、説明書に従って作製した。RNA転写のためのテンプレートを得るために犬CD56のPCR産物を含むプラスミドDNAを制限酵素 *Nco I* または *Spe I* で切断した。それぞれの一本鎖DNAから、SP6またはT7によるrun-off転写法で、DIG-11-UTPを標識した特異的なCD56一本鎖RNAプローブを作製した。CD56RNAプローブは、使用時まで-80°Cで保存した。

(2) サンプルの準備

PBMCと ACLを 1.0×10^6 個ずつシランコートスライドガラス (MASコートスーパーフロストスライドガラス、松浪硝子工業、大阪) に塗抹して2時間風乾して*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。また陽性対照として、犬の脳皮質を用いた。Tissue-Tek OCTコンパウンド (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Netherlands) で包埋し、10 μ mの凍結切片を作製した。4%パラホルムアルデヒド (PFA ; Paraformaldehyde) で30分間固定し、PBSで数回洗浄した後脱水処理し、使用時まで-80°Cで保存した。

(3) *In situ* ハイブリダイゼーション

In situ ハイブリダイゼーションは、Kimuraら (2004) の行った方法を一部改変して下記のとおり行った。すなわち、シランコートスライドガラスに塗抹したPBMCとACLを、4% PFA加PBSで30分間固定し、PBSで3回洗浄した。終濃度5 μ g/ $\square$ lのプロテインアーゼ K (Roche Diagnostics) で 37 °C、20分間処理し、4% PFAで10分間再固定して0.1Mのリン酸緩衝液 (PB ; Phosphate buffer, pH7.4) で洗浄した。次いで各スライドガラスを0.2NのHClで10分間処理し、PBで洗浄後、0.25%無水酢酸含 0.1 Mトリエタノールアミン (pH8.0) でアセチル化して再度PBで洗浄後、エタノールで脱水して風乾した。DIG標識CD56アンチセンスRNAプローブをハイブリダイゼーション液 (50%ホルムアミド、10 mM Tris-HCl pH7.6、tRNA 200 μ g/ml、1 $\times$ デ

ンハルト液、10%硫酸デキストラン、600 mM NaCl、1 mMエチレンジアミン四酢酸、0.25%ドデシル硫酸ナトリウム) で100倍希釈し、85°Cで3分間変性した後各スライドガラスに載せてカバーガラスで密封し、95°Cで5分間、氷上で1分間処理した。その後47°Cの湿潤環境で16時間反応させた。反応後、5×SSC溶液 (0.75M NaCl、75mM sodium citrate、pH7.0) でカバーガラスを除去し、50%ホルムアミド/ 2×SSC溶液で30分間、0.2×SSC溶液で20分間 (2回)、いずれも47°Cで洗浄した。ハイブリダイゼーションプローブは、アルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体キット (DIG Nucleic Acid Detection Kit ; Roche Diagnostics) を用いて反応させ、nitroblue tetrazolium chloride (NBT) / 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) 液により発色させて検出した。なお、発色時間は2時間とした。陰性対象としてセンスプローブを用いた。

9) 統計学的解析法

すべての結果は、平均±標準誤差 ($M \pm SE$) で示した。PBMCおよびACLのCD56 mRNA発現量の変化と、PHA刺激前後でのPBMCのCD56 mRNA発現量の変化はWilcoxon符号順位検定により有意差を検出した。危険率 (p) が0.05より小さい場合に統計学的に有意差ありとした。

3. 結 果

1) CD56 の検量線

定量 PCR の有効性について調べるため、標準 DNA コピー数が 7.0×10^0 から 7.0×10^6 となる CD56 PCR 産物の各希釈液をそれぞれ増幅し、得られた Ct 値とコピー数から検量線を作成した。その結果、図 1-1 に示す高い相関係数 (r^2) 0.9916 の検量線が得られ、コピー数と Ct 値との相関性が確認された。GAPDH においても同様に相関性が確認された（データは示していない）。

2) PCR 法による犬正常組織における CD56 mRNA の発現

(1) 逆転写 PCR 法

健常ビーグル犬から抽出した大脳皮質、肺、肝臓および腎臓の cDNA を PCR 法により CD56 mRNA の発現を観察したところ、大脳皮質、腎臓および肺で 266bp のバンドを認めた。このバンドの塩基配列を調べた結果、犬の CD56 の塩基配列と一致した。このバンドは肝臓には認められなかった（図 1-2）。

(2) 定量 RCR 法

同様に、大脳皮質、肺、肝臓および腎臓における CD56 mRNA 発現量を定量 PCR 法により測定し、そのコピー数を GAPDH に対する相対値で表した。同じ材料を 3 回測定したところ、得られた CV (coefficient of variation) 値は、大脳皮質 0.0006%、肺 0.0071%、肝臓 0.0085% および腎臓 0.0066% と安定していた。今回実験に用いた健常犬では、調べたすべての臓器に CD56 mRNA が認められたが、発現量は脳が最も高く、次いで肺、腎臓、肝臓の順であった（図 1-3）。

3) PBMC の増殖率

健常犬 5 頭より採取された PBMC は、培養開始時 $1.1 \sim 3.0 \times 10^7$ 個（平均 2.0×10^7 個）であったが、14 日間の培養により $0.5 \sim 2.2 \times 10^9$ 個（平均 1.3×10^9 個）に増加した。増殖率は PBMC 数とそれぞれの培養によって得られた ACL 数とから算出した。その期間の増殖率は 20.4～112 倍（平均 65.2 倍）であった。

4) PBMC および ACL の CD56 mRNA の相対定量

健常犬 3 頭より採取した PBMC および培養によって得られた ACL の CD56 mRNA 発現を定量して GAPDH に対する相対値を調べた結果、すべての犬において、PBMC および ACL には共に CD56 mRNA が発現していた（図 1-4）が、PBMC より ACL において CD56 mRNA 発現量が有意に高かった ($p < 0.01$)。

5) PHA 刺激前後の CD56 mRNA の相対定量

健康犬 3 頭より採取した PBMC および PHA 刺激 PBMC の CD56 mRNA 発現量を定量して GAPDH に対する相対値を調べた結果、PBMC より PHA 刺激 PBMC の CD56 mRNA 発現量が有意に高かった (図 1-5 ; $p < 0.05$)。

6) PBMC および ACL における CD56 mRNA の局在

In situ ハイブリダイゼーションにより CD56 mRNA の局在を調べたところ、PBMC では細胞質に CD56 のシグナルが認められた細胞がごくわずかに存在した (図 1-6A)。14 日間の培養により得られた ACL では CD56 のシグナルが認められた細胞が増加した (図 1-6B)。陽性対照として用いた犬の脳皮質では神経細胞の細胞質に CD56 のシグナルが認められた (図 1-6C)。陰性対照として用いたセンスプローブでは CD56 のシグナルを有する細胞は認められなかった (図 1-6D)。

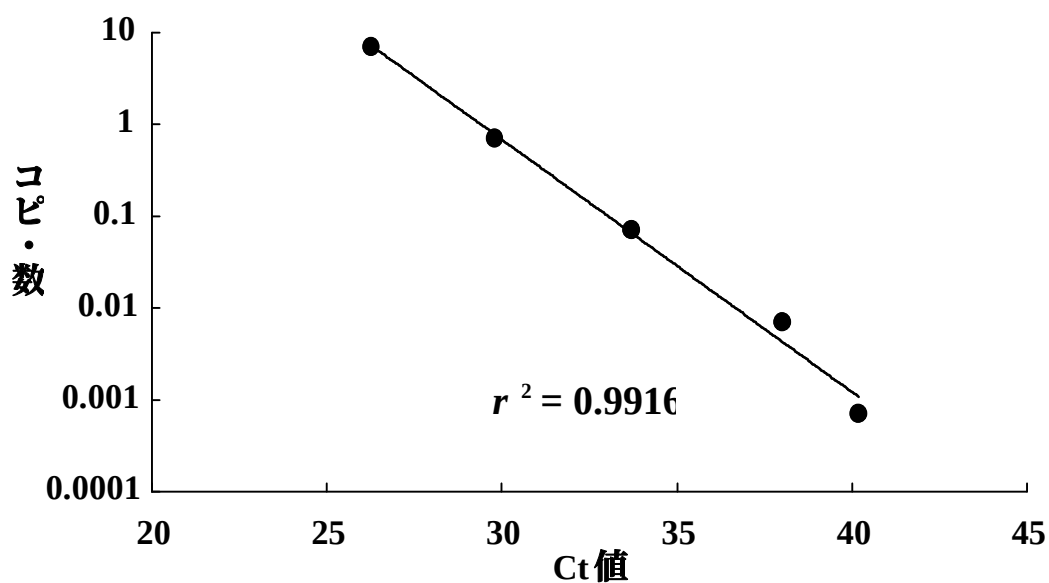


図 1-1. CD56 の検量線

CD56 の PCR 産物の分子量とアボガドロ係数よりコピー数を算出し、そのコピー数が 7×10^0 から 7×10^{-6} となる階段希釈を行った。この 7 段階希釈溶液をテンプレートとしてリアルタイム PCR を行い、対数増幅期に達したサイクル数 (Threshold cycle ; Ct 値) とコピー数から検量線を作成した。その結果得られた相関係数 (r^2) は 0.9916 と高く、コピー数と Ct 値との相関性が確認された。

(Hoshino ら、2008(a))

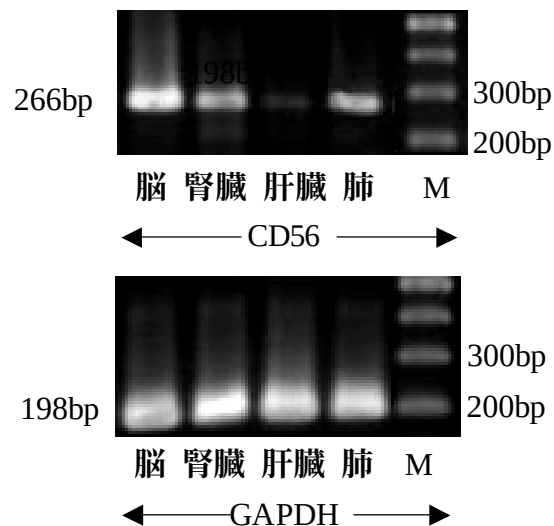


図 1-2. PCR 法による正常組織の
CD56 および GAPDH 発現

PCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。肝臓以外でバンドが認められ、この部分の塩基配列を調べた結果、犬のCD56の塩基配列と一致した。マーカー(M)として100bpラダーを用いた。

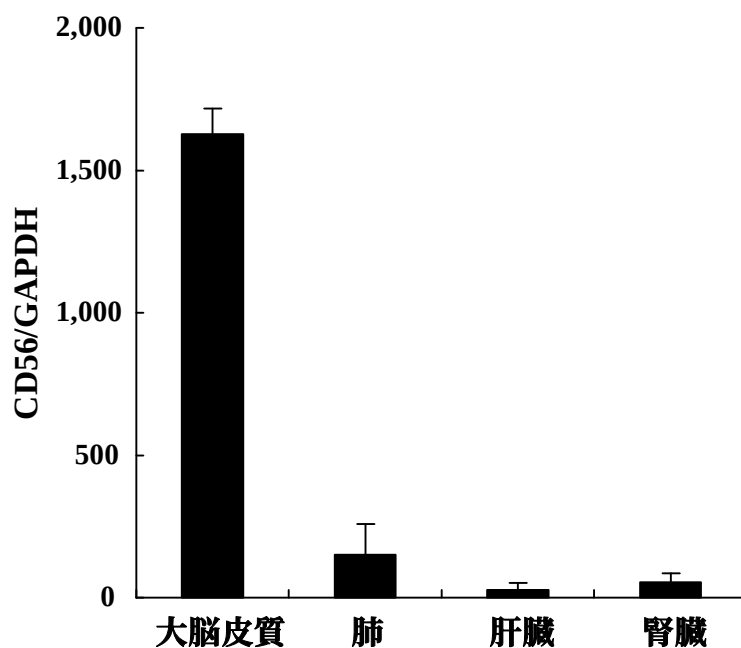


図 1-3. 犬正常組織における CD56 mRNA 発現量の比較

犬正常組織の CD56 mRNA 発現量を定量 PCR 法により測定し、そのコピー数を GAPDH に対する相対値で示した。グラフは平均 ± 標準誤差 (M ± SE) で表した (n=3)。調べた健常犬の各臓器では、すべてに CD56 mRNA が認められたが、発現量は脳が最も高かった。

(Hoshino ら、2008(a))

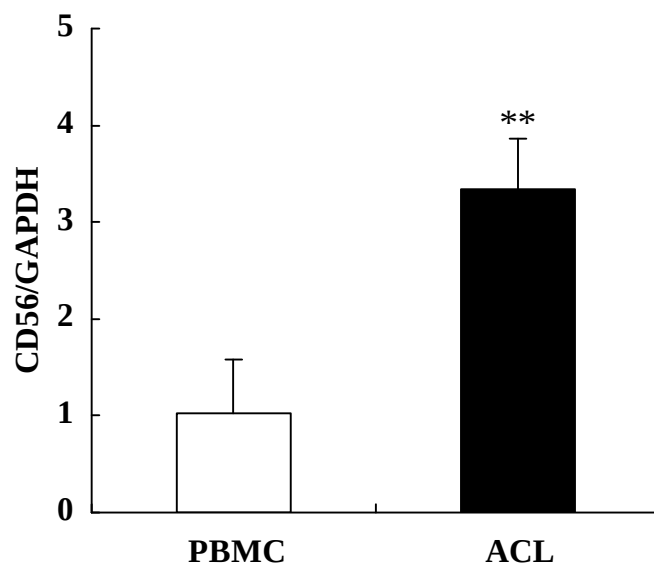


図 1-4. PBMC および ACL における CD56 mRNA 発現量

定量的 PCR 法を用いて PBMC および ACL の CD56 mRNA 発現量を測定した (n=5)。グラフは $M \pm SE$ で表した。今回用いたすべての健常犬の PBMC および ACL に CD56 mRNA が発現していたが、PBMC より ACL の CD56 mRNA 発現量が有意に高かった (** : $p < 0.01$)。

(Hoshino ら、2008(a))

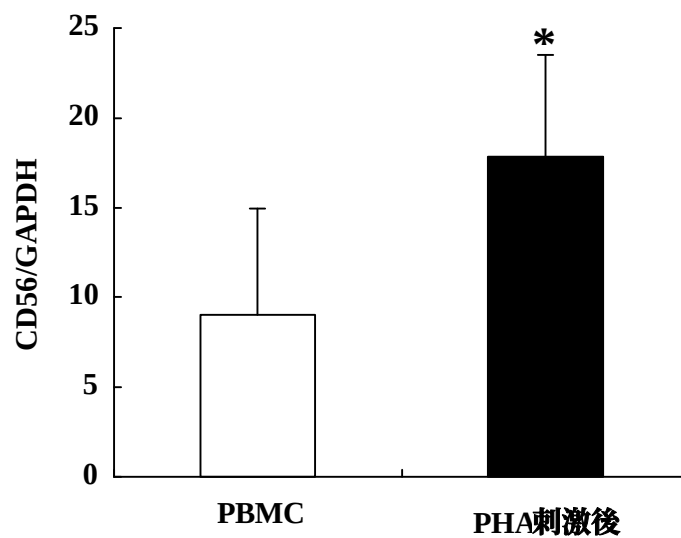


図 1-5. PBMC および PHA 刺激後の PBMC における CD56 mRNA 発現量

定量的 PCR 法を用いて PBMC および PHA 刺激後 PBMC における CD56 mRNA 発現量を測定した ($n=3$)。グラフは $M \pm SE$ で表した。PBMC より PHA 刺激後 PBMC の CD56 mRNA 発現量が有意に高かった (* : $p < 0.05$)。

(Hoshino ら、2008(a))

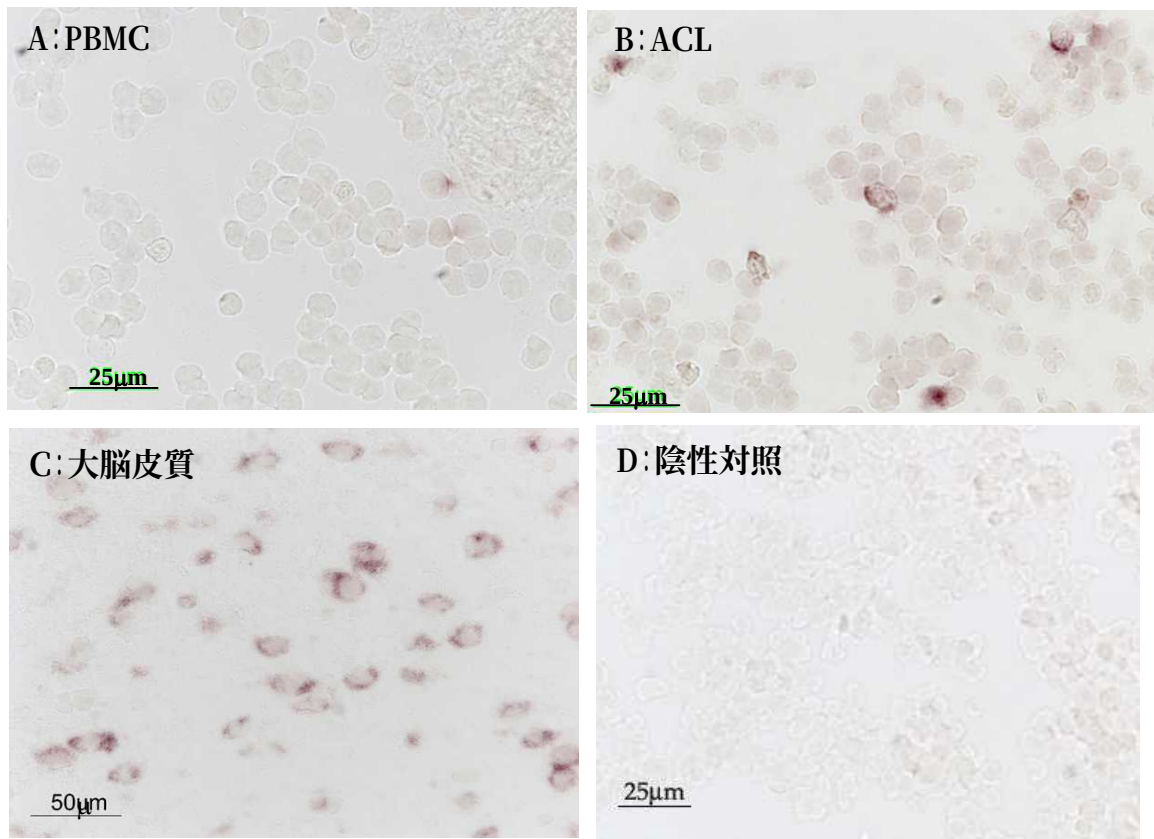


図 1-6. 健常犬の脳皮質およびリンパ球における CD56 mRNA の局在

In situ ハイブリダイゼーション法により CD56 mRNA の局在を分析した。
茶色に染色された部位が陽性を示す。

- A：PBMC の塗抹標本。CD56 のシグナルが認められる細胞がごくわずかに存在した。
- B：ACL の塗抹標本。PBMC と比較すると CD56 のシグナルが認められる細胞が増加した。
- C：陽性対照には犬の脳皮質の凍結切片を用いた。神経細胞の細胞質に CD56 のシグナルが認められた。
- D：陰性対照として ACL に CD56 センスプローブを用いた。CD56 のシグナルを有する細胞は認められなかった。

4. 考 察

本章では、定量 PCR を用いて犬の主要臓器やリンパ球の CD56 mRNA 発現量の相対定量を試みた。測定に要したサンプル量は RNA レベルで 200 ng であり、これは細胞数にすると約 1.0×10^4 個と少量で、全行程が約 6 時間と比較的短時間で CV 値が極めて低くて安定した測定が可能であった。

犬の正常主要臓器での CD56 mRNA 発現量を測定して GAPDH に対する相対値で表したところ、大脳皮質が最も発現量が高く、次いで肺、腎臓、肝臓の順であった。CD56 は、脳組織で神経細胞の同種接着に関与する等神経系の発達に重要な役割を果たしている (Filiz ら、2002 ; Thierry ら、1982) ため、大脳皮質での発現量が高かったものと考えられた。肺での発現は、気管支上皮細胞と平滑筋細胞の相互作用を補助することによって気管支の機能を保っているため (Filiz ら、2002) と考えられた。腎臓でもわずかに発現が認められたが、CD56 は間葉系組織の形態発生に重要な役割を果たしており、上皮系へと転化するにつれて徐々にその発現が低下すると報告されている (Filiz ら、2003)。今回用いた犬が成犬であったために発現量が低かったものと考えられた。また逆転写 PCR にて発現が認められなかった肝臓においても、より感度の高い定量 PCR にて発現量を相対定量することが可能であった。ヒトにおいて CD56⁺T 細胞は肝臓で分化する胸腺外分化 T 細胞である (Musha ら、1998 ; Sato ら、1995) とされているため、肝臓にもごくわずかに CD56 が発現していたのは犬においても同様の現象があるためであると推察された。

この定量 PCR 法を用いて PBMC と ACL の CD56 mRNA を相対定量するため、犬の PBMC を抗 CD3 抗体および IL-2 存在下で培養して ACL の誘導を試みた。培養開始時の PBMC から経時的に細胞数を計数していった結果、ACL の細胞数は徐々に増加し、14 日間の培養により最終的に PBMC の 20 倍以上に増加した。リンパ球は活性化されないと増殖しない (Grimm、1986) ため、本章で用いた培養法で得られた細胞は活性化されたリンパ球集団であると考えられた。

同じ細胞数あたりの PBMC と ACL の CD56 mRNA 発現量を測定した結果、測定したすべての犬で PBMC に比べて ACL の CD56 mRNA 発現量が有意に高かった。このことより今回の培養法により CD56 mRNA 発現量が増加したといえる。また、PHA で刺激した PBMC でも CD56 mRNA 発現量が増加した。PHA は T 細胞増殖因子 (Nowell、1960) であるが、PHA により刺激された T 細胞が増加

することにより IFN- γ の産生量が増加し、NK 細胞などの CD56⁺細胞が増加したため (Bonkobara ら、2005)、結果的に CD56 mRNA 発現量が増加したのではないかと考えられた。PBMC から接着細胞およびナイロンウール付着細胞を除去した非接着性 PBMC でも、CD56 mRNA 発現量が増加する傾向がみられた (データは示していない)。これらの方法はいずれも NK 細胞を増加させる方法と考えられているため (Lazda と Baram、1979)、これらの処置により CD56 mRNA 発現量が増加したという事実から、ヒトの NK 細胞と同様に犬の NK 細胞においても CD56 が発現している可能性が示唆された。

PBMC と ACL について、*in situ* ハイブリダイゼーションにより CD56 mRNA の局在を分析した結果、PBMC ではごく一部の細胞の細胞質にシグナルが認められたが、ACL では、その割合は PBMC と比較すると高かった。しかし、ヒトでは末梢血リンパ球の 10~15% が CD56⁺NK 細胞であり (Hercend ら、1985; Lanier ら、1986)、それと比較すると今回用いた健常犬の PBMC では CD56⁺細胞数および発現量は共にかなり少なかった。

以上の結果より、今回用いた PCR 法により比較的簡便に犬の CD56 mRNA 発現量を相対定量することが可能であった。その方法を用いて、犬の PBMC を調べた結果、CD56⁺細胞がごくわずかに存在し、さらに今回用いた PBMC の刺激培養法によりリンパ球が活性化され、それらの CD56⁺細胞の割合が増加した。したがって、犬においてもその CD56 発現と NK 細胞との関連が推察された。しかし、今回は遺伝子としての CD56 発現が検出できたにすぎない。実際作用を発現するのはタンパク質としての CD56 であるため、今後は CD56 の抗体の作製が望まれる。

5. 要 旨

本章では、ヒトにおいて NK 細胞の主要なマーカーであるとされている CD56 の犬での測定系を作成した。すなわちリアルタイム PCR 法を用いて相対定量を行い、健常ビーグル犬の主要臓器、PBMC および刺激培養したリンパ球における CD56 mRNA 発現量を測定した。また、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて PBMC および刺激培養したリンパ球の CD56 mRNA の局在を調べた。

その結果、主要臓器では脳における CD56 mRNA の発現量が最も高く、また刺激培養したリンパ球では PBMC に比べて CD56 mRNA 発現量が高かった。*In situ* ハイブリダイゼーション法により PBMC ではごくわずかであった CD56 mRNA のシグナルを認める細胞が、刺激培養したリンパ球では増加した。

以上のことから、犬の CD56 mRNA の臓器発現はヒトと同様であり、刺激培養したリンパ球では発現量および発現細胞ともに増加することが確認された。犬の末梢血に CD56 を有する細胞が存在し、その細胞はリンパ球に対する活性化刺激で増加することが示唆された。

第 2 章 健常犬における培養活性化リンパ球の性状およびその繰り返し投与による健常犬の免疫動態への影響

1. 序

活性化リンパ球療法は、腫瘍に罹患した症例の血液より採取したリンパ球をサイトカインにより刺激培養して細胞傷害性の強いリンパ球を誘導し、当該症例に投与する方法（Grimm ら、1983；Nishimura ら、1992）である。本療法では投与されたリンパ球自体の細胞傷害効果と、その細胞が産生する様々なサイトカインにより生体内で細胞傷害性 T リンパ球や NK 細胞の作用増強による細胞性免疫の活性化による腫瘍細胞傷害効果との両者が期待されており、ヒトでは症例が免疫抑制状態に陥っていてもある程度の効果が見込まれる（Grimm ら、1983）ことから、小動物領域においても免疫療法の一つとして適応が試みられている。

しかしながら、実際の臨床例では腫瘍の臨床ステージ、あるいは全身状態など様々な要因によってリンパ球の活性化状態が大きく変動し、その状態を推し量ることは容易ではない。また、ヒト医学では、活性化リンパ球培養法によって得られる細胞は、CD3⁺T 細胞や NK 細胞である（Grimm、1986）といわれており、培養後の細胞では細胞傷害能力が上昇することがわかっている（Wang ら、2002）。犬のリンパ球においても、抗 CD3 抗体および IL-2 と培養すると細胞数が増加することは報告されている（Itoh ら、2003）が、それらの細胞の詳細な性状や、それらを繰り返し投与した際の生体の免疫動態の変化は検討されていない。

また、第 1 章で刺激培養したリンパ球に CD56 の発現量の増加が認められたことから、犬においても CD56 発現量の測定が活性化されたリンパ球の誘導指標になり得るのではないかと考えられた。

以上のような背景から、本章では活性化リンパ球投与の有用性を検討する基礎データとして、健常犬のリンパ球を培養活性化し、得られた細胞の性状を評価した。さらに、その細胞を繰り返し投与した健常犬の免疫動態を観察し、この方法の獣医領域における適応性およびその評価方法について考察した。

2. 材料および方法

1) PBMC の採取および刺激培養法

臨床上異常が認められない健常ビーグル成犬 6 頭（雄 4 頭、雌 2 頭、月齢 18～26 か月、体重 10～14 kg）から第 1 章材料および方法の第 2 項と同様の方法で PBMC を採取した。PBMC を 1.0×10^6 個/500 μ l PBS に調整し、それぞれ 500 μ l ずつマイクロチューブに分注した。1 本は CD56 mRNA の相対定量のために $5,800 \times g$ 、22°C で 1 分間遠心して上清を捨て、使用時まで -20°C で、また 2 本は表面抗原の解析用に使用時まで 4°C でそれぞれ保存した。

採取した PBMC を第 1 章材料および方法の第 3 項と同様の方法で培養して活性化し、14 日経過した細胞を ACL として PBMC と同様に回収し保存した。

2) PBMC および ACL を構成する細胞の表面抗原解析

4°C で保存した PBMC および ACL は、2 時間以内に次の検査を行った。すなわち、 $400 \times g$ 、4°C で 3 分間遠心し、上清をデカントにて除去した。1 本のチューブに陰性対象として 50 倍希釈した 10 μ l のフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Serotec Ltd.)、他の 1 本にそれぞれ 10 μ l の FITC 標識ラット抗犬 CD4 抗体 (Serotec Ltd.)、R-フィコエリスリン (PE) 標識ラット抗犬 CD8 抗体 (Serotec Ltd.) を加えて混合した。検体は氷上で 30 分反応させ、4°C の PBS で 3 回洗浄した。その後 500 μ l の PBS に再浮遊させ、フローサイトメーター (EPICS XL EXPO32 ADC ; Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, U.S.A.) にて表面抗原を解析した。

3) 細胞傷害性試験

PBMC と ACL の細胞傷害活性を比較した。培養はすべて 37°C、5% CO₂ 条件下で行った。

(1) 腫瘍細胞の培養

腫瘍細胞は、犬の自然発生腫瘍より得られた悪性黒色腫 4 細胞株 (CMec、CMM-1、CMM-2、LMec ; 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医外科学研究室の佐々木伸雄教授より分与を受けた) (Inoue ら、2004) を用いた。各腫瘍細胞は 10% FBS、10 U/ml のペニシリン G カリウム、0.1 mg/ml のストレプトマイシン、10 mM の HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]

ethanesulfonic acid) を添加した RPMI1640 で培養した。

(2) ローズベンガルアッセイ

ローズベンガルアッセイ (RBA ; Rose Bengal Assay) を用いて細胞傷害率を算出した (Gondolf ら、1996)。すなわち、腫瘍細胞浮遊液を 10% FBS 加 RPMI1640 培地で 1.0×10^6 個/ml に調節し、1 μ l ずつ 96 穴平底プレートに捲き、8 時間インキュベータ内で培養して細胞を接着させた。エフェクター細胞として PBMC および ACL を用いた。PBMC は採取後に 1 時間 10 cm プラスチックシャーレで培養して接着細胞を除いた非接着性 PBMC のみを用いた。エフェクター細胞は腫瘍細胞に対して 12.5 : 1、25 : 1、50 : 1 および 100 : 1 となるように 10% FBS 加 RPMI1640 培地で $0.125 \sim 1 \times 10^7$ 個/ml に調節し、各穴に 100 μ l ずつ分注した。陰性対象として 10% FBS 加 RPMI1640 を 100 μ l 添加した。96 穴プレートを 14 時間共培養した後、各穴を十分に混和し、培養液を吸引除去した。0.25% に調節したローズベンガル液 (Rose Bengal、和光、大阪) を 100 μ l ずつ添加し、3 分間室温で静置した後 PBS で洗浄した。50% エタノール/PBS で生細胞が取り込んだ色素を溶出し、マイクロプレートリーダー (MTP-120、コロナ電気、茨城) にて波長 562 nm の吸光度 (OD ; optical density) を測定した。細胞傷害率は次式を用いて算出した (Funk ら、2003)。

$$\text{細胞傷害率 \%} = 100 - (\text{OD}_{\text{test}} / \text{OD}_{\text{control}} \times 100)$$

test : エフェクター細胞と腫瘍細胞の混合培養 control : RPMI1640 のみ

(3) 形態学的観察

1×10^6 個/ml に調節した CMec 細胞浮遊液を 16 穴チャンバースライド (IWAKI、東京) に 150 μ l ずつ分注して 8 時間培養後、同様に用いたエフェクター細胞浮遊液をターゲット細胞との比が 100 : 1 および 50 : 1 になるように 150 μ l ずつ分注し、14 時間共培養した。各穴の培養液を除去し、PBS で洗浄した後風乾し、メタノール固定を行いギムザ液で染色して光学顕微鏡にて観察した。

4) CD56 mRNA 発現量の相対定量

PBMC と培養後 14 日目の ACL の CD56 mRNA 発現量を相対定量した。RNA の抽出、cDNA の作製および定量 PCR 法は第 1 章材料および方法の第 5、6 および 7 項と同様に行った。

5) IFN- γ 濃度の測定

IFN- γ 濃度は、犬 IFN - γ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キット (Quantikine ; R&D Systems Inc.) を使用して添付説明書に従って測定した。次項の健常犬に対する ACL の繰り返し投与における培養 14 日目の培養上清と 0、7、14、21、28、35、42、49、56 および 70 日の血清を採取し、培養細胞の IFN- γ 産生量および個体ごとの経時的な IFN- γ 濃度を測定した。

6) 健常犬に対する ACL の繰り返し投与

体重 13.3~13.7 kg の健常なビーグル成犬、雄（同腹犬、月齢 18 か月）3 頭を用いた。第 1 回目 ACL 投与時を 0 日目として、-14、0、14 および 28 日目にそれぞれ培養用の血液を 20 ml 採取し、PBMC を分離培養した。それぞれ 14 日後の 0、14、28 および 42 日目に、培養後 14 日目の細胞を ACL として回収し、自己血清と共にそれぞれの供試犬の静脈内に投与した。供試犬はその後 3 日間副作用の有無を観察した。

また培養後 14 日目の細胞を 1.0×10^6 個採取し、定量 PCR にて CD56 mRNA 発現量を相対定量した。

-14、7、14、21、28、35、42、49、56 および 70 日目に供試犬より PBMC を採取しフローサイトメトリーにて表面抗原の解析および定量 PCR にて CD56 mRNA 発現量を相対定量した。

培養液の無菌性を調べるために、14 日目の培養液を 1.0 ml マイクロチューブに採取して-20℃で保存し、発色合成基質法によりエンドトキシン濃度の測定および TaKaRa PCR Mycoplasma Detection Set（タカラバイオ㈱、滋賀）を用いてマイコプラズマの検出を行った。

7) 統計学的解析法

すべての結果は、平均±標準誤差 (M±SE) で表示した。PBMC および ACL の CD56 mRNA 発現量の変化、構成細胞比の変化、細胞傷害能力の変化および IFN- γ 産生量の変化は Wilcoxon 符号順位検定により有意差を検出した。危険率 (p) が 0.05 より小さい場合に統計学的に有意差ありとした。

3. 結 果

1) ACL の細胞数

健常犬 6 頭より採取した PBMC は、培養開始時 $1.1 \sim 3.0 \times 10^7$ 個（平均 2.2×10^7 個）であったが、14 日間の培養により $0.5 \sim 2.2 \times 10^9$ 個（平均 1.2×10^9 個）に増殖した（図 2-1）。その期間の増殖率は 18.3～112.0 倍（平均 57.4 倍）であった。

2) PBMC および ACL の表面抗原の解析による構成細胞比の変化

フローサイトメトリーを用いて健常犬 6 頭の PBMC と ACL の表面抗原を解析し、構成細胞比の変化を図 2-2 に示した。PBMC では $CD4^-CD8^-$ 細胞が多く認められた。ACL では $CD4^-CD8^+$ 細胞比が有意 ($p < 0.05$) に増加した。また、有意差は認められなかったが $CD4^+CD8^+$ 細胞比が増加する傾向が認められた。

3) 細胞傷害率の変化

PBMC と ACL の細胞傷害試験の結果は図 2-3 に示した。グラフはそれぞれ 4 種類のメラノーマ細胞に対する細胞傷害率で表した。エフェクター細胞を PBMC および ACL とし、ターゲット細胞とした犬のメラノーマ細胞とそれぞれ 100 : 1、50 : 1、25 : 1 および 12.5 : 1 で 14 時間共培養したところ、いずれの腫瘍細胞株においてもすべての倍率において ACL の細胞傷害率が上昇する傾向にあった。

4) 形態学的観察

光学顕微鏡を用いてギムザ染色標本の細胞形態を観察した。エフェクター細胞とターゲット細胞の比が 100 : 1 および 50 : 1 のいずれにおいても、PBMC ではメラノーマ細胞が数多く生存し、PBMC はメラノーマ細胞の周囲には少なかった。ACL では全体的にメラノーマ細胞の数が減少し、生存しているメラノーマ細胞の周囲には ACL の集簇がみられた。図 2-4 は 50 : 1 の標本で、図 2-4 a は PBMC、図 2-4 b は ACL を示す。

5) CD56 mRNA 発現量の変化

定量 PCR 法を用いて PBMC と ACL の CD56 mRNA 発現量を比較した結果、ACL の CD56 mRNA 発現量が高い傾向がみられた (図 2-5)。

6) 健常犬に対する ACL の繰り返し投与の影響

観察期間中供試犬の一般状態は良好で、特に副作用と思われる反応は認められなかった。いずれの培養上清においてもエンドトキシン濃度は検出限界以下 ($< 5 \text{ pg/ml}$) であり、マイコプラズマも検出されなかった。

(1) 細胞数

3 頭の健常ビーグル犬から 2 週おきに 4 回採血し回収した PBMC を 14 日間培養して得られた ACL の PBMC に対する細胞数を回数ごとの平均値に換算して増加率を計数したところ、第 1 回目 1.92 倍、第 2 回目 2.18 倍、第 3 回目 5.69 倍、第 4 回目 9.38 倍と、回数を重ねるごとに得られる ACL の数が増加する傾向がみられた (図 2-6)。

(2) 構成細胞比の変化

得られた ACL の性状を評価するために、第 2、3 および 4 回培養時の PBMC と ACL の構成細胞比をフローサイトメトリーにて観察した。第 1 回目は培養細胞数が少なく測定不能であった。図 2-7 は 第 2、3、4 回目の培養細胞におけるそれぞれの平均値の推移である。測定したすべての回において $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ 細胞比および $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ 細胞比が増加し、 $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ 細胞比および $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$ 細胞比が減少する傾向がみられた。

(3) CD56 mRNA 発現量の変化

3 頭の ACL の培養回数ごとの平均 CD56 mRNA 増加率を図 2-8 に示した。すべての回において PBMC より ACL において CD56 mRNA 発現量が増加する傾向がみられ、第 1 回目 ($p < 0.01$)、第 2 回目 ($p < 0.01$) および第 4 回目 ($p < 0.01$) の増加率は有意であった。

(4) ACL の IFN- γ 産生量

培養 14 日目の培養上清の IFN- γ 濃度を ACL の IFN- γ 産生量として ELISA により測定した。培養回数ごとに 3 頭の平均を図 2-9 に表した。コントロールである CM 培地に対して 回とも有意に高い IFN- γ 産生量を示した (すべて $p < 0.01$)。

(5) ACL を繰り返し投与した際の免疫動態の変化

PBMC を構成する細胞比の経時的な変化をフローサイトメトリーにより調べたところ、第3回 ACL 投与時とその1週間後を比較すると $CD4^+CD8^-$ 細胞比の減少、 $CD4^+CD8^+$ 細胞比および $CD4^-CD8^+$ 細胞比の増加が認められた。第4回 ACL 投与時とその1週間後にも同様の変化が認められた。いずれも ACL 投与2週間後には投与前と同様の比に戻った。3頭とも同様の変化を示したが、最も変化の大きかった犬 A のグラフを図 2-10 に示した。なお、細胞の実数に関しても同様の変化が認められた。

PBMC の CD56 mRNA 発現量を相対定量したところ、特徴的な変化はみられなかった（データは示していない）。

血清中の IFN- γ 濃度を図 2-11 に示した。グラフは3頭の平均で表した。14日目の第2回 ACL 投与までは IFN- γ 濃度は検出限界以下であったが、21日目（ACL 2回目投与1週間後）から49日目（ACL 4回目投与1週間後）までは徐々に IFN- γ 濃度が増加し、3頭すべてにおいて49日目にピークを示した。その後は徐々に減少し、70日目（ACL 投与終了1か月後）ではピーク時の約50%までに減少したが、依然高い値を保っていた。

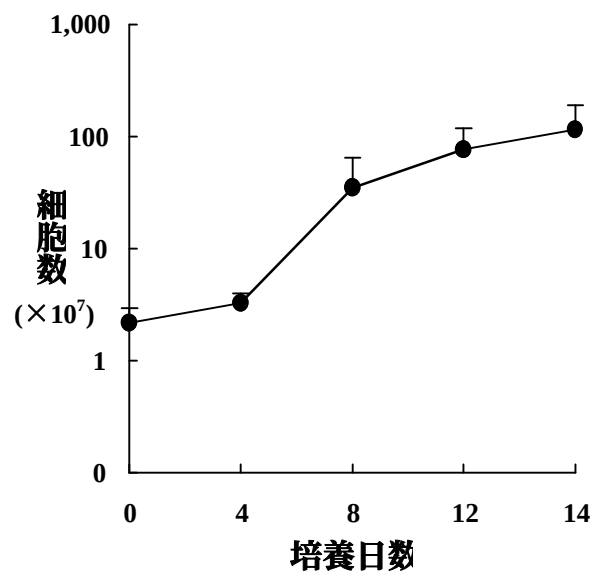


図 2-1. ACL の細胞数の推移

培養開始時 $1.1 \sim 3.0 \times 10^7$ 個 (平均 2.2×10^7 個) であった PBMC は 14 日間の培養により $0.5 \sim 2.2 \times 10^9$ 個 (平均 1.2×10^9 個; 約 57 倍) に増加した ($n=6$)。グラフは平均 $\pm$ 標準誤差 ($M \pm SE$) で表した。

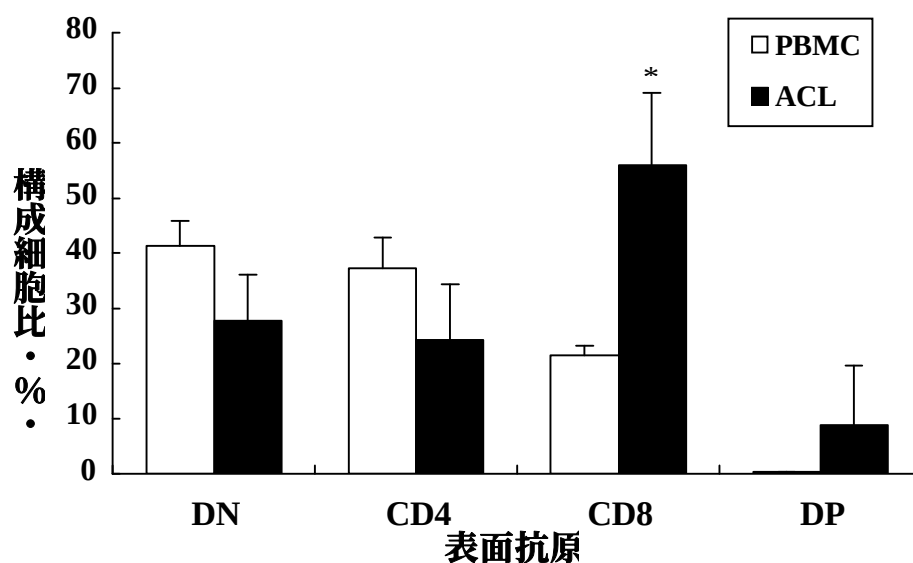


図 2-2. PBMC および ACL の構成細胞比の変化

フローサイトメトリーを用いて PBMC および ACL の表面抗原を解析した ($n=5$)。グラフは $M \pm SE$ で表した。ACL では $CD4^-CD8^-$ (DN) 細胞比および $CD4^+CD8^-$ 細胞比が減少し、 $CD4^-CD8^+$ 細胞比および $CD4^+CD8^+$ (DP) 細胞比が増加する傾向を示した。特に $CD4^-CD8^+$ 細胞比の増加は有意であった (* : $p < 0.05$)。

(Hoshino ら、2008(b))

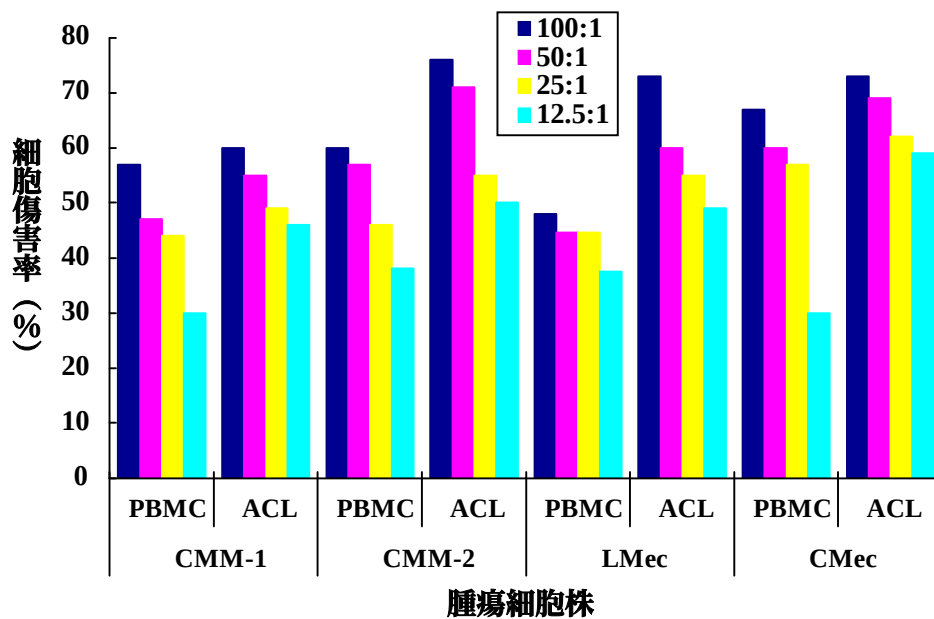


図 2-3. メラノーマ細胞に対する細胞傷害活性の変化

エフェクター細胞を PBMC および ACL とし、ターゲット細胞として 4 種類のメラノーマ細胞を用いて細胞傷害率を算出した ($n=1$)。横軸を各腫瘍細胞株とし、エフェクター：ターゲット比を■=100:1、■=50:1、■=25:1、■=12.5:1 で表しそれぞれ PBMC と ACL とを比較した。

いずれの細胞株においても、すべての倍率において ACL の細胞傷害率が上昇する傾向が得られた。

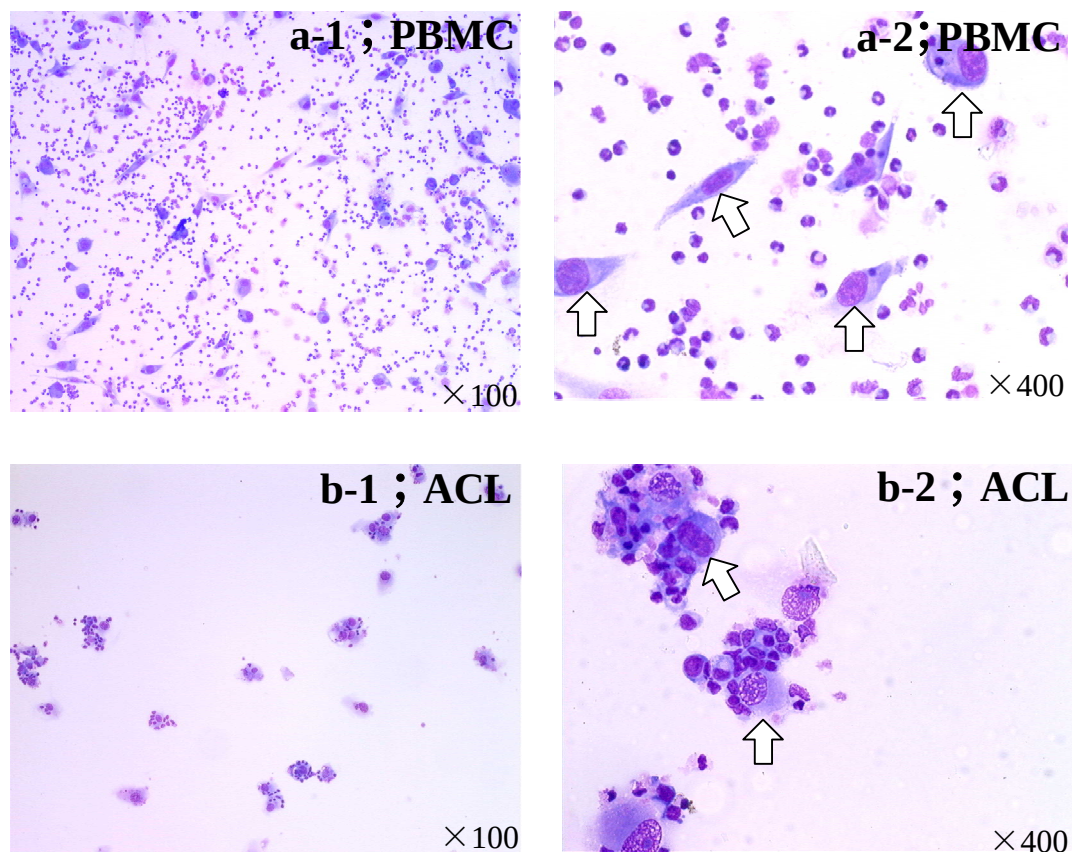


図 2-4. ギムザ染色標本 (エフェクター:ターゲット = 50:1)

PBMC および ACL はチャンバースライドを用いて培養しているため、活性化されていない PBMC ではリンパ球を含む浮遊細胞は洗浄操作により多くが消失している。スライド上には単球や好中球を含む付着細胞が存在している。ACL でも付着細胞であるメラノーマ細胞に付着しているリンパ球以外は消失している。↑はメラノーマ細胞を示す。

- a-1. PBMC (×100): メラノーマ細胞が数多く生存している。
- a-2. PBMC (×400): メラノーマ細胞と PBMC は離れて存在。
- b-1. ACL (×100): 生存しているメラノーマ細胞はごくわずか。
- b-2. ACL (×400): メラノーマ細胞の周囲に ACL の集簇がみられる。

(Hoshino ら、2008(b))

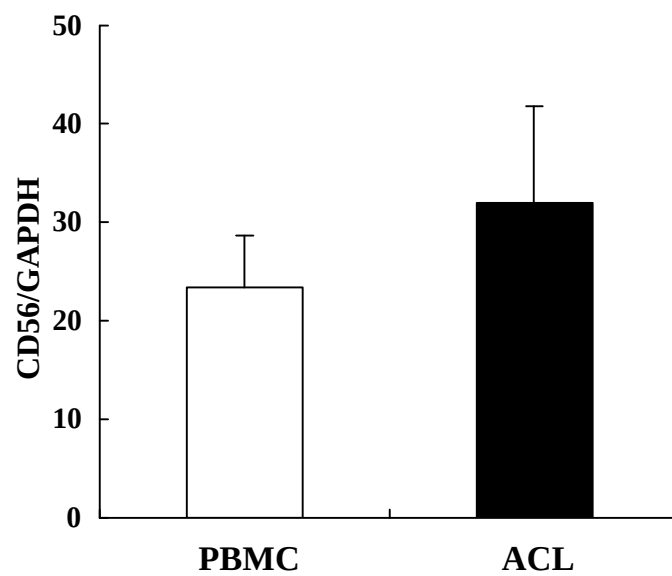


図 2-5. PBMC および ACL の CD56 mRNA 発現量

定量 PCR 法を用い PBMC と ACL の CD56 mRNA 発現量を比較した結果、ACL の CD56 mRNA 発現量が高い傾向が得られた (n=4)。グラフは $M \pm SE$ で表した。

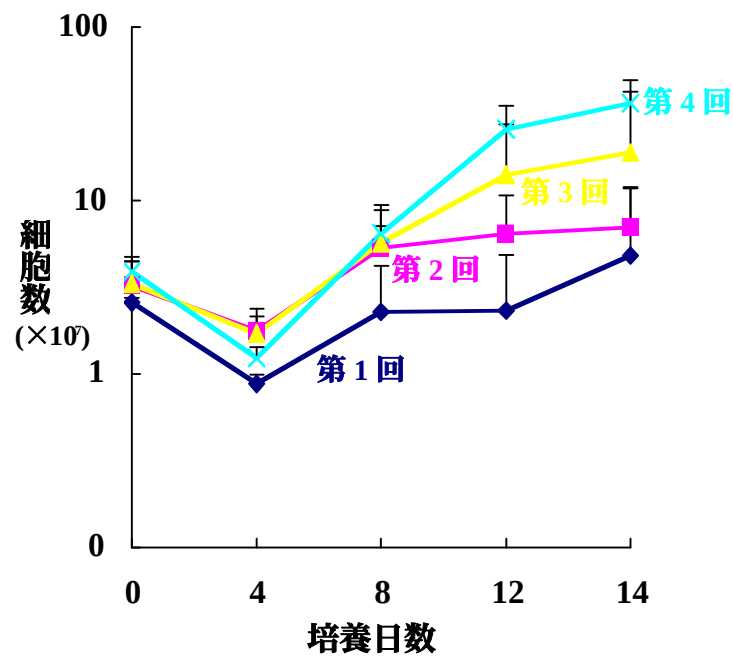


図 2-6. 採血回数毎の細胞数の変化

3頭の健常ビーグル犬から2週おきに4回採血し回収したPBMCを14日間培養して得られたACLのPBMCに対する細胞数の変化を調べた(n=3)。グラフは $M \pm SE$ で表した。回数が増すごとに得られるACLが増加する傾向を示した。

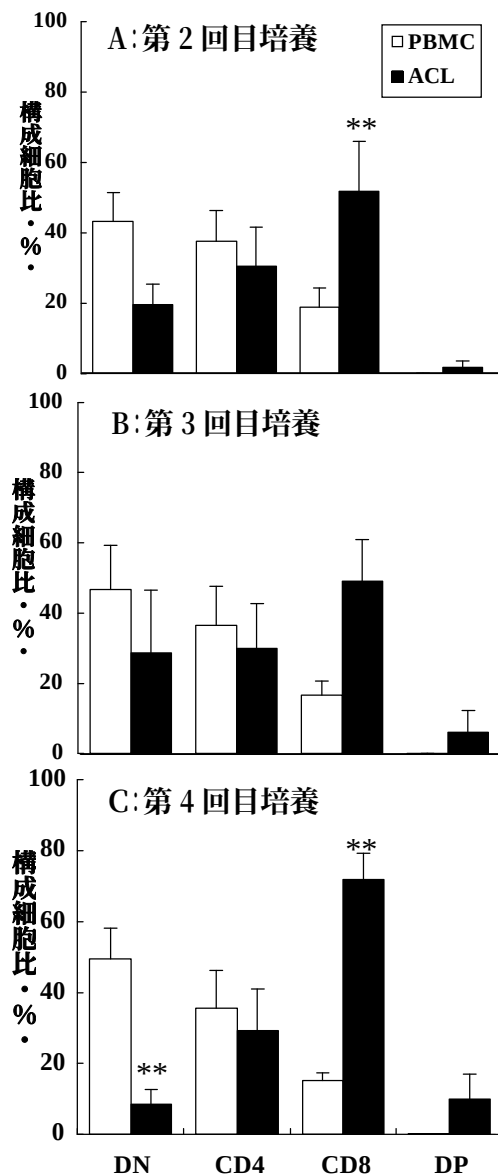


図 2-7. 培養回数ごとの構成細胞比の変化

すべての回において、ACL において DN 細胞比および $CD4^+CD8^-$ 細胞比が減少し、 $CD4^+CD8^+$ 細胞比および DP 細胞比が増加する傾向がみられた ($n=3$)。特に 2 回目と 4 回目の DN 細胞比の減少および 4 回目の $CD4^+CD8^+$ 細胞比の増加は有意であった (** : $p<0.01$)。グラフは $M \pm SE$ で表した。第 1 回目は細胞数が少なかったために実施していない。(Hoshino ら、2008(b))

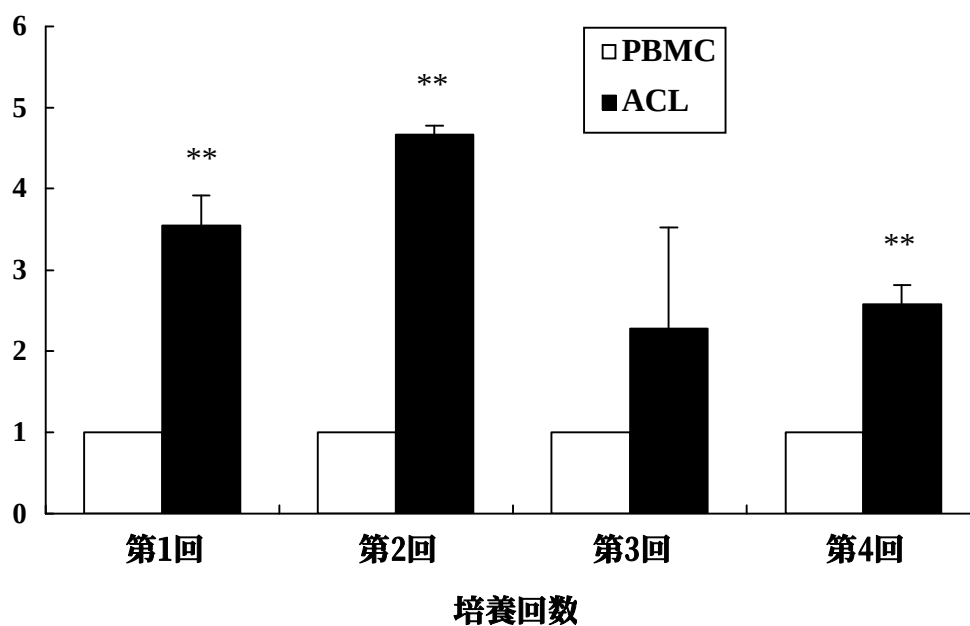


図 2-8. 定量 PCR 法による CD56 mRNA の増加率

リアルタイム PCR を用いて PBMC および ACL の CD56 mRNA 発現量を相対定量した ($n=3$)。ACL の CD56 mRNA 発現量は PBMC を 1 とする増加率で表した。すべての回において PBMC より ACL の CD56 mRNA 発現量が増加する傾向が得られ、第 1 回目、第 2 回目および第 4 回目の増加率は有意であった (** : $p < 0.01$)。グラフは $M \pm SE$ で表した。
(Hoshino ら、2008(b))

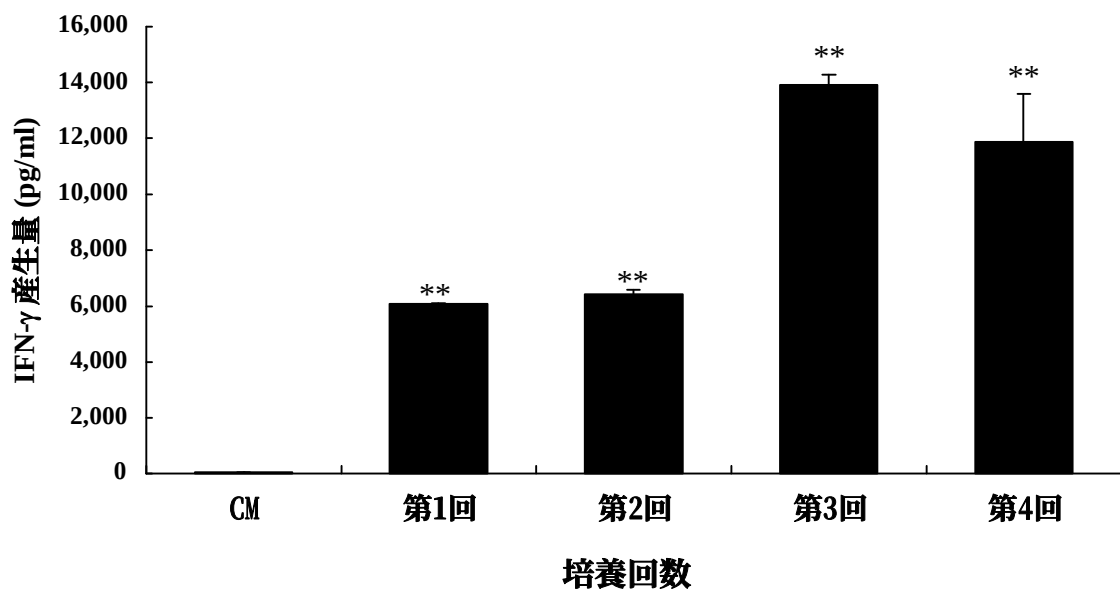


図 2-9. ACL の IFN- γ 産生量

培養上清の平均 IFN- γ 濃度を培養回数ごとに表した ($n=3$)。グラフは $M \pm SE$ で表した。陰性対照として用いた complete medium (CM) の IFN- γ 濃度に対して全ての回の ACL とも有意に高い値を示した (** : $p < 0.01$)。

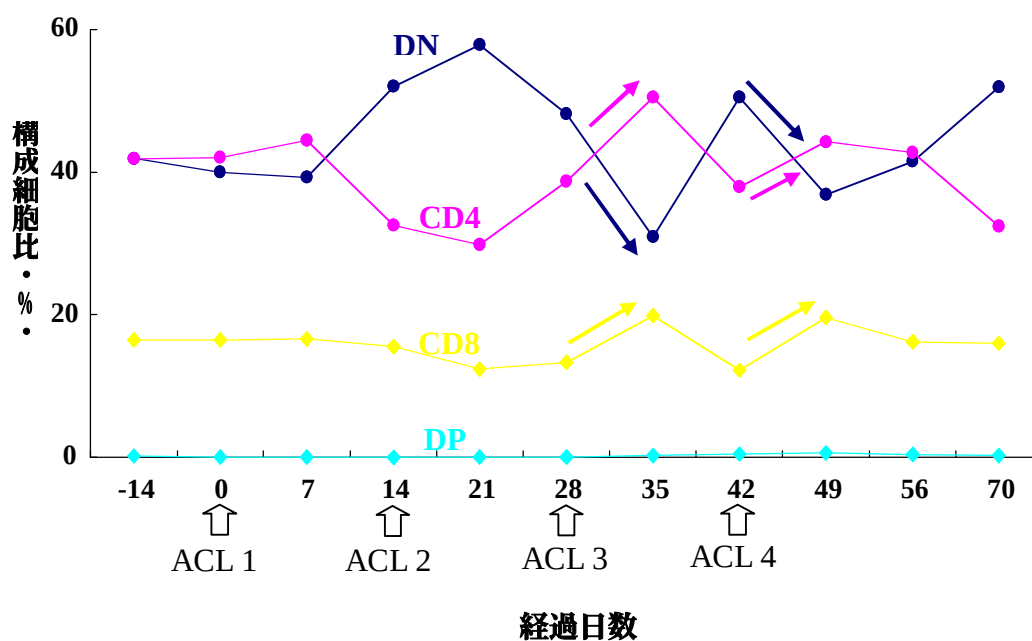


図 2-10. PBMC を構成する細胞比の経時的な変化

供試犬 A における観察期間中の構成細胞比の変化を示した。ACL 投与日を $\cap$ 示した。28 日（第 3 回 ACL 投与日）とその 7 日後を比較すると DN 細胞比の減少、 $CD4^+CD8^-$ 細胞比および $CD4^-CD8^+$ 細胞比の増加が認められた。42 日（第 4 回 ACL 投与日）とその 7 日後にも同様の変化が認められた。両方とも ACL 投与 2 週後には投与前と同様の比に戻った。

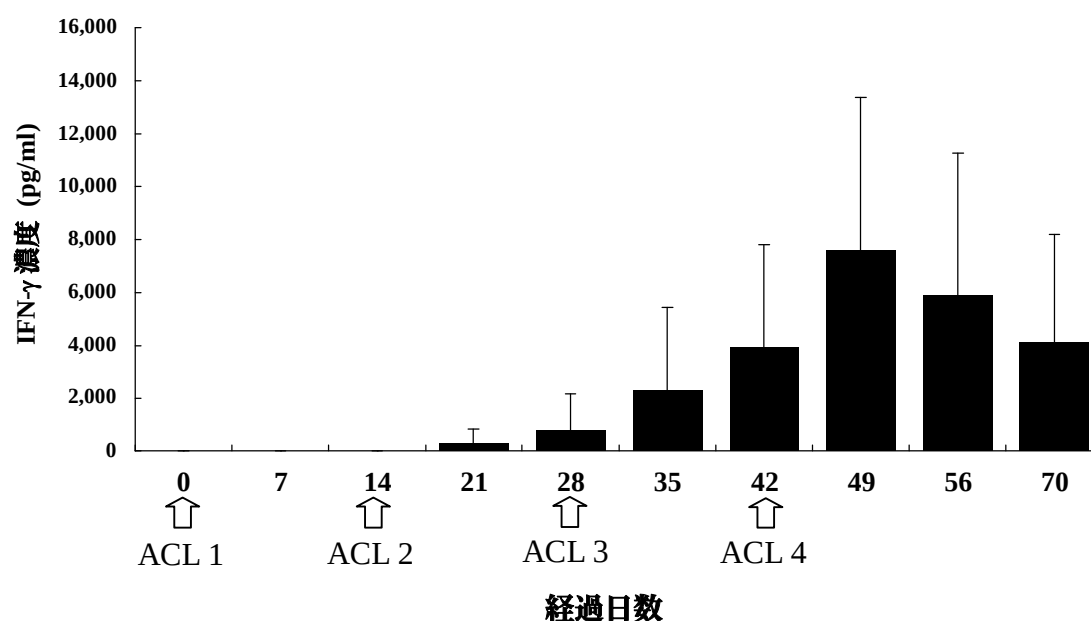


図 2-11. 健常犬の IFN- γ 濃度の経時的変化

血清中の IFN- γ 濃度を測定した ($n=3$)。グラフは $M \pm SE$ で表した。ACL 投与日を $\cap$ で示した。14 日目の第 2 回 ACL 投与までは IFN- γ 濃度は検出限界以下であったが、21 日目 (ACL 2 回目投与 1 週間後) から 49 日目 (ACL 4 回目投与 1 週間後) までは IFN- γ 濃度が徐々に増加し、3 頭すべてにおいて 49 日目にピークを示した。その後は徐々に減少し、70 日目 (ACL 投与終了 1 か月後) ではピーク時の約 50% にまで減少したものの、依然高い値を保っていた。

4. 考 察

本章では犬のリンパ球を活性化させる方法として、Itoh ら (2003) の方法を用い、さらに再活性化法として Ebina ら (1998) の方法を用いた。すなわち、マウス抗イヌ CD3 抗体と hr IL-2 を用い PBMC を 14 日間刺激培養し、NK 活性を上昇させるために hr IFN- α と hr IL-2 を用いて再活性化するという方法により犬の活性化リンパ球の誘導を試みた。

本章で実施した培養法により、犬の PBMC を 14 日間で平均 57.4 倍に拡大培養することが可能であった。14 日間の培養で得られた ACL は PBMC と比較すると CD4⁻CD8⁺細胞比および CD4⁺CD8⁺細胞比が増加した。CD4⁻CD8⁺細胞は一般的に CTL の大部分を占めるとされ、その細胞傷害作用は MHC class I 拘束性で、特異的かつ強力である (Reinherz と Schlossman、1980)。CD4⁺CD8⁺細胞は、未成熟なリンパ球でその後 CD4⁺CD8⁻あるいは CD4⁻CD8⁺へと分化する (von Boehmer と Fehling、1997)。

また、ACL のメラノーマ細胞に対する細胞傷害能力は培養により増強した。メラノーマ細胞の周囲を取り囲むように複数の ACL が存在しており、Henkart (1994) の報告と同様に何らかの接着分子を介してメラノーマ細胞のアポトーシスが誘導されたのではないかと考えられた。今回のメラノーマ細胞は樹立された細胞株を用いているために得られたリンパ球とは明らかに MHC が異なっている。そのため、この傷害作用は MHC 非拘束性の細胞によるものと思われる。MHC 非拘束性の細胞傷害を示す代表的な細胞は NK 細胞および NKT 細胞である (Bendelac ら、1997; Farag と Caligiuri、2006)。NK 細胞はヒトにおいて CD4⁻CD8⁻細胞である (Farag と Caligiuri、2006; Lanier ら、1986) とされているが、今回用いた 14 日間の培養により CD4⁻CD8⁻細胞の割合は減少した。さらに、ヒトにおいて NK 細胞のマーカーであるとされている CD56 遺伝子 (Takahashi ら、2006) 発現量は ACL では増加傾向にあったものの、有意差は得られなかった。以上のことから、犬の NK 細胞に CD56 が発現しているか否かは未だ明確ではないが、今回増強した細胞傷害作用は NK 細胞のみによるものではないと思われる。本章では Itoh ら (2003) の報告と同様に培養に抗 CD3 抗体を用いているために得られた細胞のほとんどは CD3⁺であると考えられる。また CD4⁻CD8⁺細胞の増加がみられたがヒトにおける NKT 細胞はほとんどが CD3⁺であり、CD4⁻CD8⁺の細胞も存在する (Takahashi ら、2002)。そのため、今回増強した細胞傷害は NK 細

胞および NKT 細胞の両作用である可能性が考えられた。

以上のことより、本章の培養法で得られた細胞は活性化されたリンパ球が主体の細胞集団と考えられる。ヒト医学において同様の方法を用いて培養した細胞の構成比を調べた報告では、90%以上が T 細胞で、残り数%が NK 細胞であるとされている (Roussel ら、1990)。

ACL を健常犬に繰り返し投与した後の PBMC の動態を経時的に調べた結果、ACL の投与を重ねるごとに培養によって得られる細胞数が増加する傾向が得られた。これは培養された $CD4^+CD8^-$ 細胞の投与により IL-2 の分泌が促進されて T 細胞が増殖した (Mosman ら、1986) ことにより、活性化された T 細胞が増加したため、投与回数に伴い得られる細胞が増加したのではないかと推測された。

ACL では すべての犬において IFN- γ 産生量が増加し、 $CD4^-CD8^+$ 細胞比の顕著な増加がみられた。特に第 4 回目培養の ACL における $CD4^-CD8^+$ 細胞比の増加は顕著であった。また、第 3 回および第 4 回投与 1 週間後に $CD4^-CD8^-$ 細胞比の減少、 $CD4^+CD8^-$ 細胞比の増加および $CD4^-CD8^+$ 細胞比の増加が認められ、同時期に血清中の IFN- γ 濃度がピークを示した。培養により活性化した $CD4^+CD8^-$ 細胞および $CD4^-CD8^+$ 細胞を供試犬に投与することにより、体内で IL-2 や IFN- γ の分泌が促進され、それらのサイトカインにより T 細胞の増殖や NK 細胞の増殖・活性化などが起こり、その結果として血清中の IFN- γ 濃度が上昇した (Callan ら、2000 ; Chen ら、1986) と考えられた。血清 IFN- γ 濃度は投与に伴って徐々に増加した。IFN- γ は NK 細胞の活性化を促進する (Scott と Trinchieri、1995) ため、ACL を繰り返し投与した後の PBMC の細胞傷害能力は投与前に比べて増強しているのではないかと推察された。IFN- γ 濃度のピークは 49 日目に認められ、その後徐々に低下した。また構成細胞比の変化も ACL 投与 2 週目には投与前と同様の比に戻った。これらの反応は 3 回目の投与後にみられていることから、今回は 3 頭のみでしか行っていないために確実ではないが、活性化リンパ球の投与を 2 週間毎に少なくとも 3 回以上行うことにより免疫応答の活性化が誘導できる可能性が示唆された。また、CD56 発現量については、PBMC では発現量のごくわずかであったためか、経時的な変化の傾向は認められなかったが、ACL では PBMC にくらべて細胞数あたりの発現量が増加していた。そのため、ACL では $CD56^+$ 細胞が増加したと推測された。さらに、マイトジェンで活性化されたリンパ球では発現が認められるという報告 (Bonkobara ら、2005) も存在するため、定量 PCR 法による CD56 の相対定量法は、活性化リンパ球誘導の指

標の一つになり得るのではないかと考えられた。

生体内の免疫動態の把握という観点では、本章の結果から判断すると、血清中の IFN- γ 濃度および PBMC 構成細胞比の変動を観察していくことで、ある程度可能なのではないかと考えられた。ヒト医学においては免疫抑制酸性蛋白（immunosuppressive acidic protein ; IAP）などの腫瘍マーカーの測定法が確立しており、活性化リンパ球投与期間中にその数値が低下したとの報告（Ebina ら、1998）があり、効果判定法の一つとして用いられている。獣医領域でも近年、 α -1 酸性糖蛋白などを含む腫瘍マーカーの測定が可能になっており、今まで問題となっていた評価方法の一つとして期待できるのではないかと考えられている。

今回用いた犬は健常犬であり、それらの犬において構成細胞比の変化や IFN- γ の産生量増加などの反応がみられた。免疫抑制状態にある腫瘍罹患犬にこの結果が外挿できる訳ではないと思われるが本章で行った活性化リンパ球の繰り返し投与は免疫能の改善効果が期待できるか、あるいは QOL の改善につながる可能性が期待された。

5. 要 旨

本章では、ヒト医学において臨床応用されている活性化リンパ球療法の、小動物への適応を調べるためにまず健常犬の PBMC を抗 CD3 抗体、hr IL-2 および hr IFN- α を用いて活性化し、得られた細胞の性状を解析した。すなわち表面抗原解析による構成細胞比の変化、細胞傷害能力の変化、CD56 mRNA 発現量の変化などを調べた結果、得られた細胞は活性化されたリンパ球であることが判明した。

次いでこの活性化されたリンパ球を健常犬に繰り返し投与し、その生体反応を詳細に観察した。その結果、繰り返し投与により健常犬の PBMC 中の CD4⁺CD8⁻細胞比および CD4⁻CD8⁺細胞比の増加と血清 IFN- γ 濃度の上昇が認められた。このことより細胞性免疫応答の活性化が起こったものと推察された。また、特に副作用と思われる反応は認められなかった。

以上のことから、抗 CD3 抗体、hr IL-2 および hr IFN- α により活性化リンパ球の誘導が可能であること、およびその細胞を繰り返し投与する活性化リンパ球療法は健常犬において免疫応答を活性化させる可能性が示唆され、腫瘍罹患犬への適応が期待された。

第3章 活性化リンパ球療法を実施した腫瘍罹患犬 10 症例

1. 序

小動物においてもヒトと同様に腫瘍の完全な制御が腫瘍治療の目的であるが、現実には様々な理由でその目的が達成されない場合が多い。治療のために行った放射線や化学療法などによる重篤な副作用が原因で治療法の選択が制限される場合も少なくない (Wolfesberger ら、2006)。そのような場合には、腫瘍と共存しながら QOL を保つことも治療の一つの目的となる (Ebina ら、2003)。そこで、副作用の少ない新たな治療戦略が求められている。

第2章において、活性化リンパ球の繰り返し投与は健常犬に対して副作用を全く示さず、免疫反応を活性化する可能性が示された。ヒトにおける腫瘍罹患症例は一般的に免疫抑制状態に陥っていることが多い (Tada ら、1990; Yamamoto ら、1995; Zou ら、1992) ことから、そのような症例に対して活性化リンパ球を投与することによって免疫機能の賦活が期待されており、犬においても同様と考えられる。

本研究における活性化リンパ球培養法によって得られる細胞は、ヒトにおいてはほとんどが $CD3^+$ の T 細胞である (Ebina ら、2001; Roussel ら、1990) と考えられている。犬においても第2章の結果から、細胞傷害性が強いといわれている $CD4^-CD8^+$ 細胞や、IL-2 を分泌して NK 細胞や $CD4^-CD8^+$ 細胞を活性化する $CD4^+CD8^-$ 細胞などが多く増殖し、これらを投与することによる直接的な細胞傷害効果と、分泌される IFN- γ や IL-2 などによる免疫賦活作用の両方による抗腫瘍効果が期待できるのではないかと考えられた。またヒトにおいて活性化リンパ球は症例の QOL を改善する効果があったと報告 (Ebina ら、2003) されており、犬においても同様の効果が期待される。

本章では、北海道大学大学院獣医学研究科附属動物病院に来院した悪性腫瘍罹患犬に他の治療法と併用して活性化リンパ球療法を実施し、QOL や免疫動態を観察してその有効性について評価した。

2. 材料および方法

1) 症 例

2005 年 3 月から 2007 年 9 月に北海道大学大学院獣医学研究科附属動物病院に来院した悪性腫瘍罹患犬（例外：症例 9、確定診断実施していない）10 症例（表 3-1）。

原則として、何らかの方法で原発腫瘍の制御を行った後、飼い主の同意を得て活性化リンパ球の繰り返し投与を実施した。

2) ACL の培養および投与法

症例の一般状態および体重に応じて 10～40 ml を採血し、第 1 章材料および方法の第 2 項と同様の方法で、比重遠心法にて PBMC を分離した。次いで、抗 CD3 抗体を固着させた 75 cm² フラスコにて第 1 章材料および方法の第 3 項と同様の方法で 2 週間培養して再活性化した細胞を ACL として自己血清と共に症例の静脈内に投与した。

ACL の投与は 2～4 週間隔で 4～12 回実施した（表 3-2）。

3) 活性化リンパ球療法の評価項目

(1) PBMC の増殖活性

それぞれの症例の PBMC 数と 14 日間の培養により得られた ACL 数の平均をそれぞれ計数し、細胞増殖率を算出した。

(2) PBMC および ACL の細胞傷害率

症例 1 の PBMC および ACL の、メラノーマ細胞株（CMec 細胞）に対する細胞傷害率を、第 2 章材料および方法の第 3 項と同様に RBA を用いて算出した。

(3) PBMC および ACL を構成する細胞の表面抗原解析

フローサイトメトリーによって PBMC および ACL の細胞表面抗原の解析を行い、構成細胞の変化を観察した。細胞表面抗原の解析法は第 2 章材料および方法の第 2 項と同様に行った。

(4) PBMC および ACL の CD56 mRNA 発現量の相対定量

定量 PCR を用いて PBMC および ACL の CD56 mRNA 発現量の変化と、経時的に PBMC の CD56 mRNA 発現量を測定した。RNA の抽出、cDNA

の作製および定量 PCR 法は第 1 章材料および方法の第 5、6 および 7 項と同様に行った。

(5) 血清 IFN- γ 濃度の測定

すべての症例で血清中の IFN- γ の濃度を測定した。IFN- γ 濃度は、第 2 章材料および方法第 5 項と同様に Quantikine (Canine IFN- γ immunoassay, R&D Systems Inc.) を用いて添付説明書に従って測定した。

(6) 副作用の有無、経過および飼い主の印象

ACL 投与直前に、視診、聴診、血液学的および血液生化学的検査を行った。ACL 投与後に関しては、飼い主から副作用、自宅での食欲、活動性および排尿便の状態について聞き取り、記録した。投与期間中は 1 から 4 週間隔で来院し、その後は定期的に経過を観察した。定期健診時に詳しい稟告の他、X 線検査および超音波検査によって腫瘍の再発および転移の有無を確認した。

3. 結 果

1) 細胞増殖率

すべての症例における PBMC の平均増殖率と診断からの生存期間を表 3-3 に示した。症例 1 および 2 はそれぞれ 17.42 倍、15.60 倍と顕著な増殖を示したが、症例 3、5、6 および 7 の増殖率は 1 以下であった。10 症例の平均増殖率は 4.94 倍であった。また、PBMC の増殖率の高い症例では生存期間が長い傾向が認められた。

症例 4（骨肉腫）では、同時期に化学療法としてドキソルビシンおよびカルボプラチンの投与を実施したが、化学療法実施期間中は細胞増殖が抑制された（図 3-1）。化学療法終了後は少し増殖率が回復したが、実施前ほどは回復しなかった。

原発腫瘍に対する治療前および後での細胞増殖率の観察が可能であった症例 6（悪性組織球肉腫）では、原発腫瘍に対する治療として行った断脚手術後において細胞の増殖率が上昇した（図 3-2）。

2) PBMC および ACL の非特異的な細胞傷害率の変化

ACL 投与実施前に PBMC を採取し ACL を培養することが可能であった症例 1（骨肉腫）の PBMC および ACL の細胞傷害率を図 3-3 に示した。すべての倍率において、PBMC に比較すると ACL の非特異的な細胞傷害率が上昇した。

3) 構成細胞比の変化

PBMC および ACL の細胞表面抗原を調べる事が可能であった症例の構成細胞比の変化を表 3-4 に示した。ACL では PBMC に比較して $CD4^+CD8^-$ 細胞の減少、 $CD4^+CD8^+$ 細胞および $CD4^-CD8^+$ 細胞が増加する傾向が認められた。 $CD4^-CD8^+$ 細胞は症例 1、2、4、6 および 8 の ACL で顕著な増加が認められた。

PBMC に関して構成細胞比の変化を示した症例 2、3 および 8 の経過を図 3-4 に示した。ACL 投与期間中に $CD4^-CD8^-$ 細胞比の減少、 $CD4^+CD8^-$ 細胞比および $CD4^-CD8^+$ 細胞比が増加する傾向が認められた。

4) CD56 mRNA 発現量の変化

すべての症例において PBMC の CD56 mRNA 発現量の変化は一定の傾向を示さなかったが、ACL ではすべての症例で PBMC と比べて CD56 mRNA 発現量が増加する傾向が認められた（表 3-5）。

5) 血清 IFN- γ 濃度の変化

症例 6 および症例 10 において、血清 IFN- γ 濃度の上昇を認めた（図 3-5）。2 症例ともに ACL 投与前は IFN- γ はほとんど認められなかったが、症例 6 では第 3 回 ACL 投与後から徐々に IFN- γ 濃度が上昇し、第 6 回投与時にピークを示した。症例 10 では第 4 回 ACL 投与後から徐々に IFN- γ 濃度が上昇した。症例 6 では ACL 投与終了後若干低下したが、2 週間後には依然として高い IFN- γ 濃度が認められた。

6) 副作用の有無、経過および飼主の印象

すべての症例において観察期間中特に飼主が気になるような副作用は認められず、QOL を良好に保つことができ、ACL の繰り返し投与に関する飼主の印象も良好であった。ACL 投与に付随したと思われる血液学的および血液生化学的検査における異常値は認められなかった。

それぞれの症例における経過を表 3-6 に示した。2007 年 12 月現在、生存 4 例、死亡 6 例である。生存している骨肉腫の 1 例（症例 1）では診断から 3 年が経過しており、症例 8 の骨肉腫においても 2007 年 12 月現在、腫瘍の再発および転移は認められていない。症例 9 は確定診断未実施の肝臓腫瘍と思われる症例であるが、今のところ明確な進行は認められていない。症例 10 は診断時すでに腹腔内に転移が認められた消化管腺癌の症例であるが、腫瘍の進行は比較的緩徐であり、QOL も十分保たれている。

死亡した症例のうち症例 2 および 7 の 2 症例は診断時すでに転移が確認されており、症例 5 は ACL 投与開始時に局所再発が認められていたが、症例 2 では 48 か月と長期生存した。診断時転移の認められなかった症例 4 および 6 は最終的に転移が認められたが、症例 3 は死亡時に腫瘍の再発および転移は認められなかった。この症例の死因は原発腫瘍と関係のない慢性腎不全による尿毒症であった。

7) 腫瘍の種類による経過

それぞれ3症例ずつ存在した扁平上皮癌と骨肉腫について表3-7に示した。

骨肉腫では死亡は症例4の1例のみであるが、いずれの症例も腫瘍の完全切除が可能であった。症例4の直接の死亡原因は播種性血管内凝固症候群(DIC)であるが、死亡時微小な肺転移が確認された。残り2例に関しては補助療法として行ったのは活性化リンパ球療法のみであるが、今のところ腫瘍の再発および転移はみられていない。

扁平上皮癌はいずれも原発腫瘍の完全切除が不可能な部位に発生したものでありACL投与開始時にすでに再発もしくは転移が確認されており、最終的にはそれらが進行した。症例2および7は転移病巣の拡大により死亡したが、症例5の直接の死亡原因は心タンポナーデによる心不全であった。

表3-1. 活性化リンパ球療法を実施した症例の内訳

症例	品種	性	年齢	体重 (kg)	腫瘍	原発腫瘍に対する治療法
1	G.R. ^{*1}	♂	7	36	左尺骨骨肉腫	前肢断脚術
2	G.R. ^{*1}	♀	7	33	鼻腔内扁平上皮癌	RT ^{*4} 、PDT ^{*5}
3	雑種	♀	13	12	膀胱移行上皮癌	膀胱部分切除
4	S.B. ^{*2}	♂	5	70	右大腿骨骨肉腫	後肢断脚術、化学療法
5	ビーグル	♀	11	14	下顎扁平上皮癌	片側下顎切除
6	G.R. ^{*1}	♂	6	44	悪性組織球肉腫	後肢断脚術
7	パピヨン	♀	12	8	前頭洞扁平上皮癌	PDT ^{*5}
8	W.C. ^{*3}	♀	9	9.4	左中足骨骨肉腫	後肢断脚術
9	G.R. ^{*1}	♂	11	29.4	? (肝臓腫瘍) ^{*6}	なし
10	シーズー	♂	7	4.2	消化管腺癌	腸切除術

^{*1} G.R. : ゴールデンレトリバー
^{*2} S.B. : セントバーナード
^{*3} W.C. : ウエルシュコーギー
^{*4} RT : 放射線療法
^{*5} PDT : 光線力学療法
^{*6} 症例9 : 確定診断未実施

表3-2. 活性化リンパ球 (ACL) 投与開始時期、
投与回数および期間

症例	ACL投与開始時期	投与間隔	実施回数	実施期間
1	断脚後4か月	3週	4	2か月
2	RT/PDT終了後12か月	2週	6	3か月
3	膀胱部分切除後2か月	2週	4	2か月
4	断脚後1か月	2週～4週	12	8か月
5	下顎切除後1か月	2週～3週	7	4か月
6	断脚後1か月	2週～4週	7	4か月
7	PDT後1か月	2週～3週	4	3か月
8	断脚後3か月	2週	6	3か月
9	仮診断後2か月	2週	6	3か月
10	腸切除後2か月	2週	6	3か月

表3-3. PBMCの平均増殖率

症例	増殖率(倍)	診断からの期間
1	17.42	>37か月；生存
2	15.60	48か月で死亡
3	0.03	14か月で死亡
4	2.59	12か月で死亡
5	0.87	6か月で死亡
6	0.57	6か月で死亡
7	0.60	4か月で死亡
8	4.34	>10か月；生存
9	4.86	>9か月；生存
10	2.56	>8か月；生存

2007年12月現在

PBMCの増殖率はPBMC数とそれぞれの培養によって得られたACL数とから算出し、症例毎に平均値を算出した。PBMCの増殖率が高い症例は、長期生存が期待される傾向がみられた。

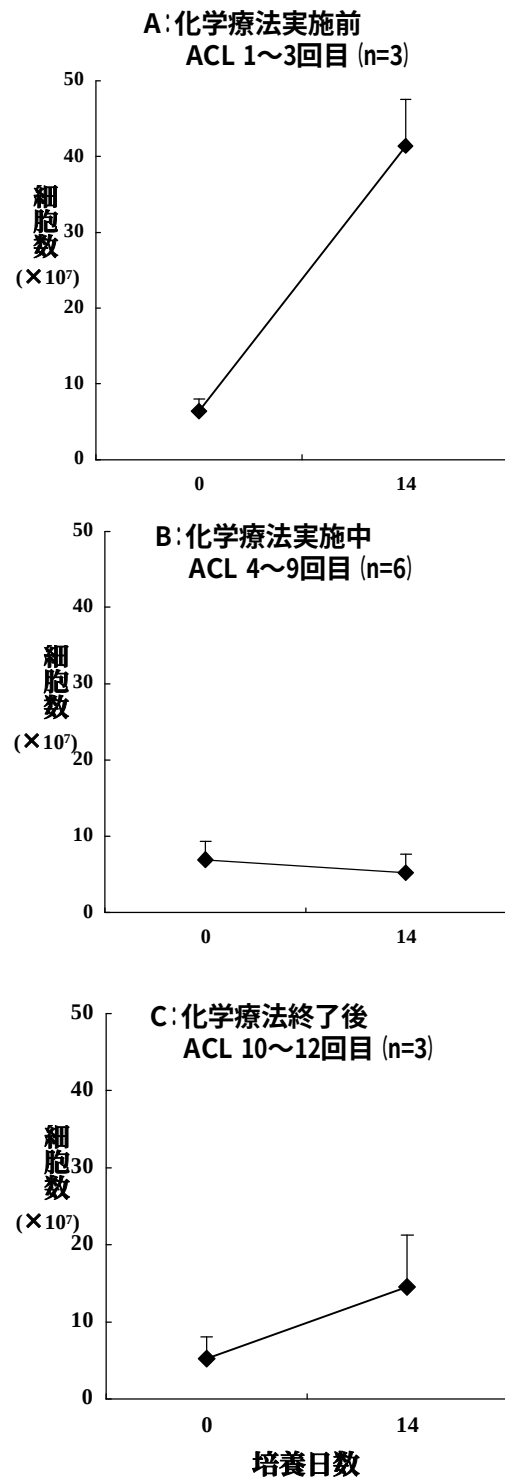


図3-1. 症例4における化学療法による細胞増殖率の変化

化学療法実施により細胞増殖が抑制された。グラフは平均 $\pm$ 標準誤差 (M $\pm$ SE) で表した。化学療法終了後は実施中よりは増殖するようになったが、実施前程は増殖しなかった。化学療法としてカルボプラチンおよびドキソルビシンの投与を3週おきに交互にそれぞれ3回ずつ行った。

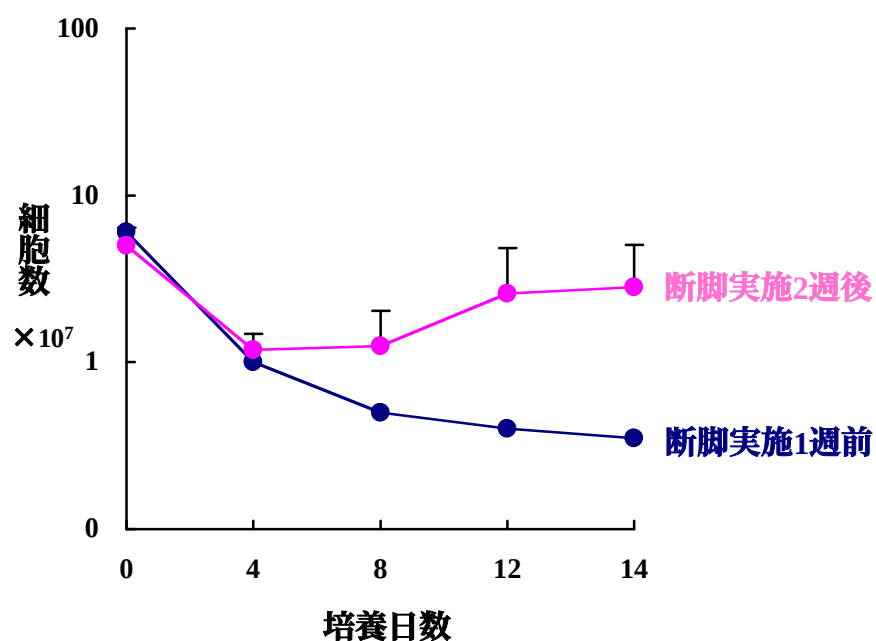


図3-2. 症例6における断脚術実施前後の細胞増殖率の変化

原発治療の制御のために断脚手術を行ったところ、断脚手術実施1週間前 (n=1) にはほとんど増殖しなかったPBMcが断脚後2週目から増加するようになった (n=6)。断脚実施後のグラフはM±SEで表した。

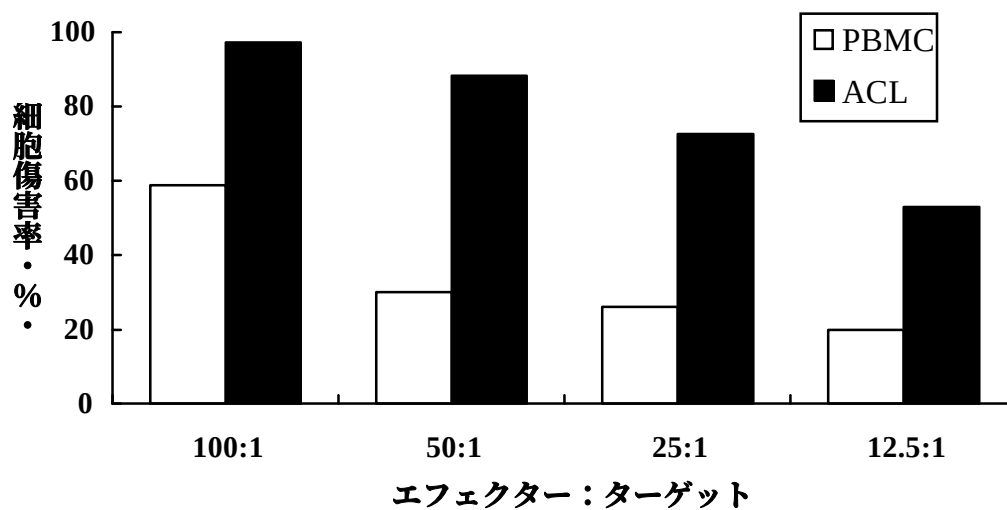


図3-3. 症例1におけるPBMCおよびACLの細胞傷害性の変化

症例1のPBMCおよびACLのメラノーマ細胞株に対する細胞傷害率を示した (n=1)。すべての倍率においてACLの細胞傷害率が増加した。

表3-4. PBMCおよびACLを構成する細胞比の変化

症例	細胞	構成細胞比(%)				CD4/CD8比
		DN	CD4	CD8	DP	
1	PBMC	86.23	11.20	3.03	0.50	3.70
	ACL	23.83	53.78	52.80	30.43	1.02
2	PBMC	67.43	28.73	4.07	0.22	7.06
	ACL	23.63	43.83	48.20	15.63	0.91
4	PBMC	48.55	24.08	27.98	0.62	0.86
	ACL	28.80	25.16	57.74	12.58	0.44
5	PBMC	30.37	33.90	36.80	1.13	0.92
	ACL	30.10	49.30	33.43	12.83	1.47
6	PBMC	62.70	26.70	10.50	0.16	2.54
	ACL	25.70	39.60	48.00	15.30	0.83
8	PBMC	61.54	27.02	12.78	1.34	2.11
	ACL	12.20	73.70	50.60	30.80	1.46
9	PBMC	37.28	24.17	38.63	0.08	0.63
	ACL	27.25	34.42	42.07	3.70	0.82
10	PBMC	31.30	27.63	41.25	0.17	0.67
	ACL	31.12	44.00	34.57	9.82	1.27

フローサイトメトリーによりPBMCおよびACLの表面抗原を解析した。調べたすべての症例でACLのDN細胞比の減少、CD4⁺CD8⁺細胞比およびDP細胞比の増加が観察された。症例1、2、4、6および8のACLではCD4⁺CD8⁺細胞比の顕著な増加が認められた。

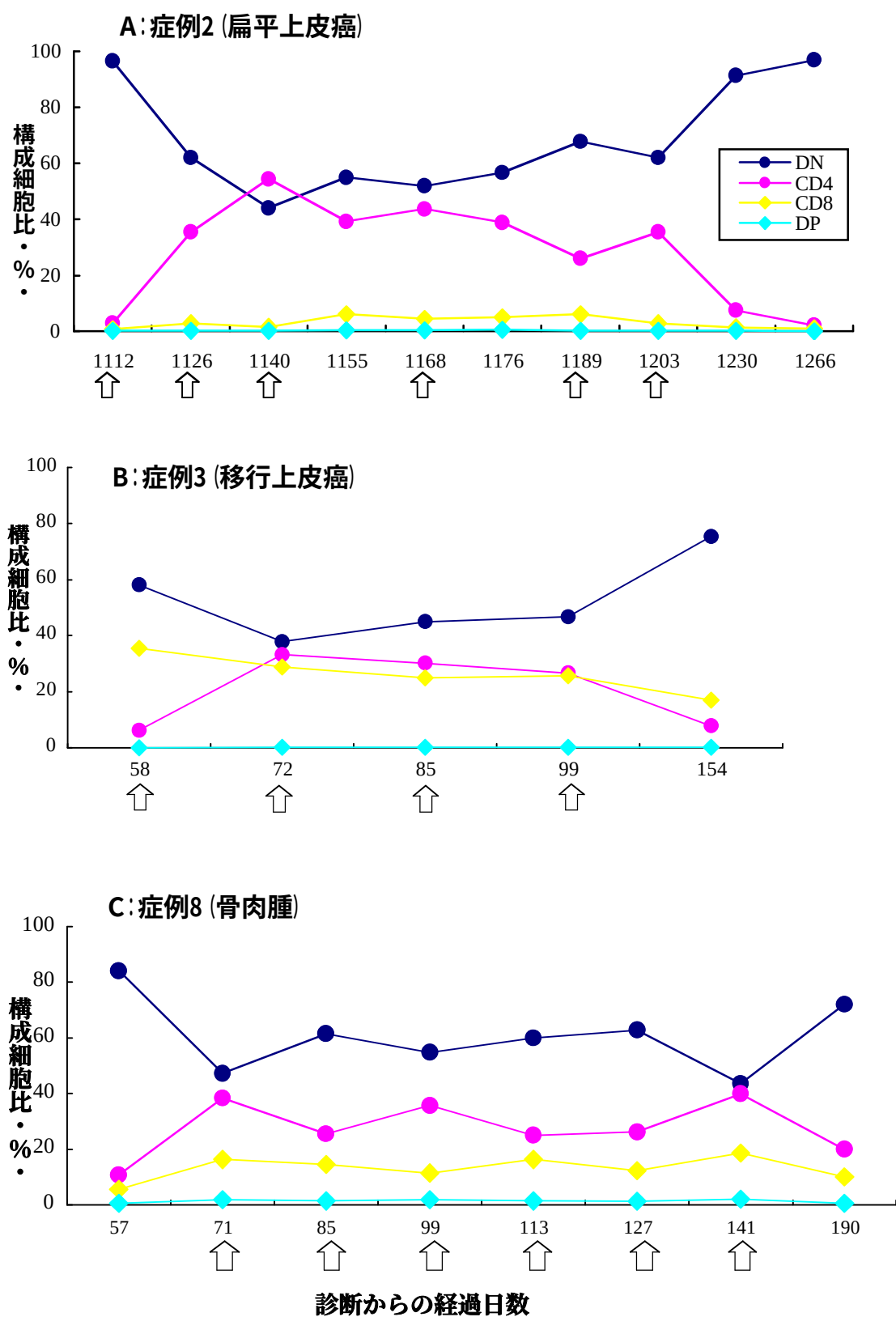


図3-4. PBMCを構成する細胞比の経時的変化

ACL投与日を↑で示した。ACL投与期間中はDN細胞比の減少、CD4⁺CD8⁺細胞比およびCD4⁺CD8⁺細胞比の増加が観察された。ACL投与終了後には元の細胞比に戻った。

表3-5. ACLにおけるCD56 mRNAの増加率

症例	CD56 mRNA 増加率
1	1.53
2	3.57
3	1.10
4	1.45
5	8.56
6	1.22
7	2.88
8	1.83
9	3.07
10	1.30

ACLの平均CD56 mRNA増加率はPBMCのCD56 mRNA発現量を1とする比で表した。

すべての症例において同じ細胞数あたりのPBMCに比べACLのCD56 mRNA発現量が高かった。

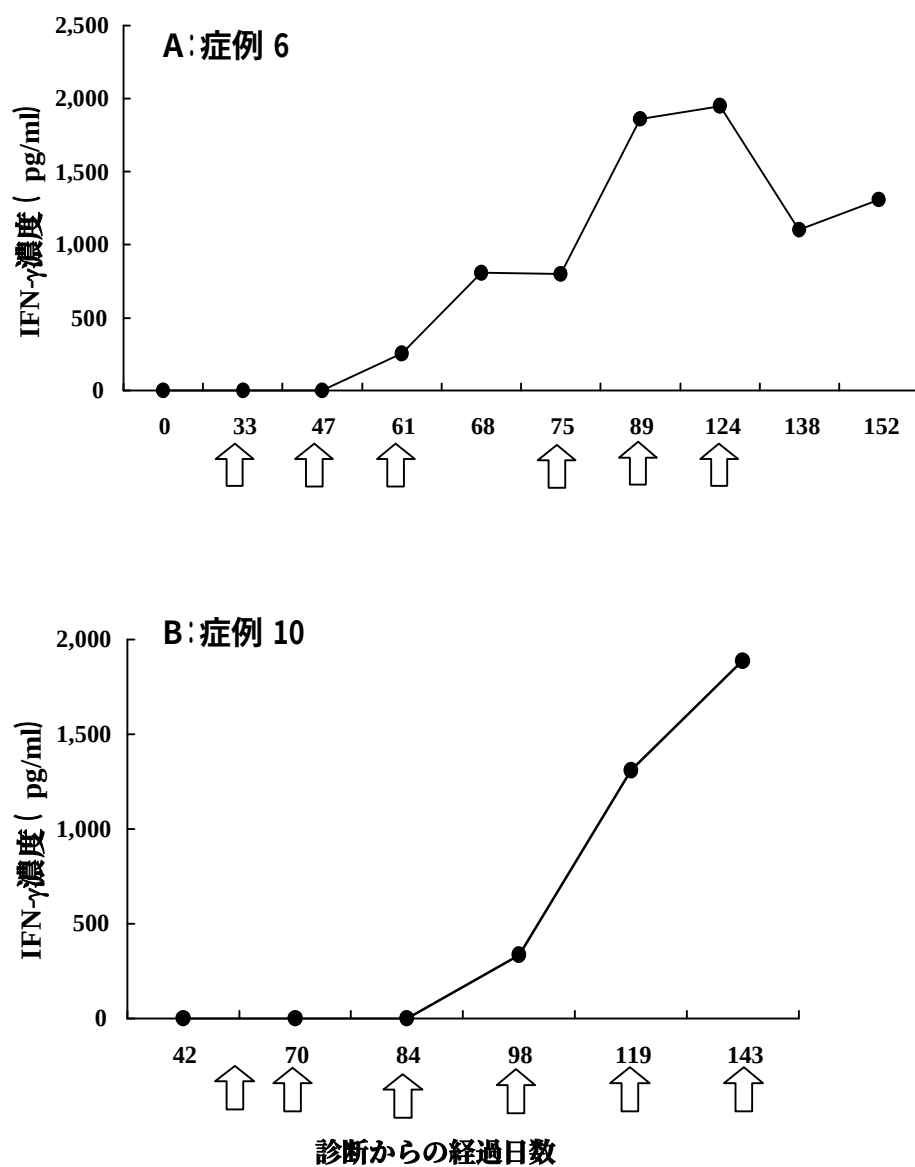


図3-5. 血清IFN- γ 濃度の変化

ACL投与日を↑で示した。

Aでは第3回ACL投与から、Bでは第4回投与から徐々にIFN- γ 濃度が上昇した。Aでは投与終了1か月後も依然として高い値を保っていた。

表3-6. 活性化リンパ球療法を実施した症例の経過

症例	腫瘍	ACL投与開始からの期間	死因	診断から死亡までの期間
1	骨肉腫	32か月	-	生存>37か月
2	扁平上皮癌	12か月後†	肺転移の拡大	48か月
3	移行上皮癌	13か月後†	慢性腎不全	12か月
4	骨肉腫	11か月後†	DIC	14か月
5	扁平上皮癌	5か月後†	心不全	6か月
6	悪性組織球肉腫	5か月後†	全身転移	6か月
7	扁平上皮癌	4か月後†	脳転移	4か月
8	骨肉腫	4か月	-	生存>10か月
9	肝臓腫瘍疑い	3か月	-	生存>9か月
10	腺癌	3か月	-	生存>8か月

DIC：播種性血管内凝固症候群

2007年12月現在

表3-7. 活性化リンパ球療法を実施した骨肉腫と扁平上皮癌の経過

	症例	発生部位	原発腫瘍の制御	再発・転移	転帰	診断からの生存期間	死亡原因
骨肉腫	1	前肢	完全	なし	生存	>37か月	-
	4	後肢	完全	肺転移	死亡	12か月	DIC
	8	後肢	完全	なし	生存	>10か月	-
扁平上皮癌	2	鼻腔	不完全	診断時肺転移あり	死亡	48か月	肺転移巣の拡大
	5	下顎	不完全	ACL投与時局所再発あり	死亡	6か月	心不全
	7	前頭洞	不完全	診断時リンパ節転移あり	死亡	4か月	脳転移

2007年12月現在

4. 考 察

本章では、第2章で検討した活性化リンパ球の培養法および評価方法を用いて、実際の腫瘍罹患犬に補助療法として活性化リンパ球療法を実施した。PBMCの増殖活性についてはかなりの個体差が認められ、14日間の培養によりPBMCが十分増加する症例、ほとんど増加しない症例など様々であり、また同一症例でも培養時期により細胞増殖に変化が認められた。ドキソルビシンとカルボプラチンによる化学療法との併用を行った骨肉腫の症例4では、化学療法実施中にはPBMCの細胞増殖力が低下した。これはドキソルビシンとカルボプラチンの細胞増殖抑制効果（Chabner と Myers、1993；Reed、1993）が現れたものと思われる。しかし、化学療法に起因すると思われるその他の副作用は認められなかった。化学療法との併用を行った症例はこの1症例のみであったが、併用しても特に問題は認められなかった。原発腫瘍に対する摘出手術前後での細胞増殖力の観察が可能であった悪性組織球肉腫の症例6では、術後に細胞増殖力が上昇した。原発腫瘍を制御することにより、抑制されていたT細胞が増加した可能性が考えられた（Nagata ら、1993；Salvadori ら、2000；Zou ら、1994）。また、細胞の増殖率の高い症例では生存期間が長い傾向にあった。特に症例1および2では健常犬のACL増殖率のほぼ下限値であった。増殖する細胞はほとんどがCD3⁺のT細胞である（Ebina ら、2001；Roussel ら、1990）ことから、これらの症例では比較的T細胞機能が保たれていたことが推測された。症例3は、診断時すでに他の症例より高齢であり、また慢性腎不全も併発していたためか細胞の増殖率は低かったが、14か月と長期生存が可能であった。高齢と慢性腎不全は、リンパ球の活性を低下させる要因であるとされている（Cohen ら、1997）。しかしながら、第2章で示した健常犬のPBMCの14日間培養後の増殖率が平均57.4倍（18.30～112.0倍）であるのに比べて本章で示した症例犬の増殖率は平均4.94倍（0.03～17.42倍）と極めて低かった。担がん宿主は腫瘍による免疫抑制状態に陥っている（Tada ら、1990；Yamamoto ら、1995；Zou ら、1992）といわれているが本章の症例犬においても同様と考えられた。

また、ACLではPBMCと比較すると腫瘍細胞傷害率の上昇、CD4⁺CD8⁻細胞比およびCD4⁻CD8⁺細胞比の増加およびCD56 mRNA発現量の増加が認められた。この結果は第2章における健常犬で誘導されたACLの性状と同様であったことから、腫瘍罹患犬でも健常犬と同様に活性化されたリンパ球の誘導が可能であ

った。

ACL 投与に伴い、ほとんどの症例で PBMC における構成細胞比の変化が認められ、 $CD4^+CD8^-$ 細胞比および $CD4^-CD8^+$ 細胞比が増加した。このことから、第 2 章の健常犬に対する反応と同様に、腫瘍罹患症例においても細胞性免疫応答が活性化した可能性が示唆された。しかし、ACL 投与終了後には再び $CD4^+CD8^-$ 細胞比および $CD4^-CD8^+$ 細胞比が減少する傾向にあった。Itoh ら (2003) の報告においても同様の現象が報告されている。このような構成細胞比の変化は ACL の投与による一時的なものであると思われた。

血清 IFN- γ 濃度の明確な変化を示した症例は、6 および 10 の 2 症例のみであった。この 2 症例においては第 2 章の健常犬と同様に ACL の投与期間中に IFN- γ 濃度が徐々に上昇し、ACL の最終投与時には投与前の 2000 倍近くに上昇していた。症例 6 では ACL の投与終了後は IFN- γ 濃度が低下する傾向を示したが、投与終了 2 週間後では依然として高い値を保っていた。ACL を繰り返し投与することにより NK 細胞等の IFN- γ 産生細胞が活性化した可能性が示唆された。

死亡した 6 例中 3 例は診断時すでに転移および再発が確認されていた。摘出手術後の ACL 投与中も転移巣は少しずつ進行したが、比較的 QOL は良く保たれていた。症例 2 では診断時すでに肺転移が確認されていたにもかかわらず、48 か月間の生存が可能であった。この症例は、比較的平均細胞増殖率が高く、また ACL 投与期間中には PBMC 中の $CD4^+CD8^-$ 細胞比および $CD4^-CD8^+$ 細胞比の増加が観察された。免疫抑制が重度でなかった可能性も考えられたが、ACL の投与が長期生存に好影響を及ぼした可能性も否定はできないと思われた。診断時転移の認められなかったのは症例 3、4 および 6 で、症例 4 の死因は DIC であるが、その時点で微小な肺転移が認められた。生存期間は診断から 48 週間と、断脚手術後に同様の化学療法の併用を実施した骨肉腫の症例報告では生存期間の中央値は 45 週間であった (Kent ら、2004) ことから、明確な延命効果は認められなかったが、化学療法による副作用を全く認めずに QOL を維持することが可能であった。症例 6 の悪性組織球肉腫では、生存期間が約 6 か月間であったために延命効果に関しては不明であるが、診断時低下していた一般状態が、ACL 投与に伴い改善したとの稟告があった。この症例では、PBMC の増殖率の上昇および IFN- γ 濃度の上昇も認められた。ACL の投与により免疫応答が活性化された結果 QOL が改善した可能性が示唆された。

骨肉腫の症例 1 においては術後 37 か月間経過していることから、寛解と判断

された。この症例は、補助療法として行ったのは免疫療法のみであった。

以上のことより、活性化リンパ球療法は、腫瘍罹患症例においても細胞性免疫応答の活性化によって症例の QOL を維持し、腫瘍の転移および増殖抑制にも有効な役割を果たす可能性があるものと考えられた。また、その細胞性免疫活性化の効果判定指標として、PBMC の構成細胞比の変動が犬で有用である可能性が示唆された。IFN- γ 濃度は腫瘍罹患症例においては個体差が大きいため、すべての症例で有用であるとはいえないが、症例によっては指標の一つとして有用かもしれない。またヒトにおいて NK 活性の指標として用いられている CD56 は、腫瘍罹患症例の ACL で発現量の増加が認められていることから、犬においては活性化リンパ球誘導の指標の一つとしての有用性が示唆された。

本章の症例においては 1 例を除いて何らかの方法で原発腫瘍を制御した後に活性化リンパ球療法を実施しており、厳密な意味での本治療法単独の抗腫瘍効果判定は難しい。おそらく今後も固形腫瘍の治療法は外科手術が第一選択であり、その他併用療法として化学療法あるいは放射線療法が中心となるため、免疫療法単独で実施されることはほとんどないものと思われる。そのため、本治療法の有効性は腫瘍の縮小効果を評価するというよりも、より多くの症例を積み重ねて再発率や生存期間あるいは QOL などを評価することが適切なのではないかと考えられた。

以上の結果より、本研究で誘導した活性化リンパ球を用いた免疫療法は従来の治療法と併用することによって症例の QOL を良好に保つことができ、犬の腫瘍罹患症例に対する補助療法として十分適用可能で、かつ有用であると考えられた。

5. 要 旨

本章では、北海道大学大学院獣医学研究科附属動物病院に来院した腫瘍罹患犬 10 症例に対して、第 2 章で検討した活性化リンパ球療法を実施した。活性化リンパ球の投与は 4～12 回、2～4 週間隔で行った。その結果、健常犬と比較すると腫瘍罹患症例では PBMC の細胞増殖率が悪く、末梢血の $CD4^+CD8^-$ 細胞および $CD4^-CD8^+$ 細胞の割合が少ないという結果が得られた。これは、腫瘍により細胞性免疫応答が抑制されているためと考えられた。しかし、腫瘍罹患症例においても 14 日間の培養により、活性化されたリンパ球の誘導が可能であった。それらの細胞の繰り返し投与の結果、PBMC の細胞増殖率の上昇、PBMC の構成細胞比の変化および血清 IFN- γ 濃度の上昇がみられた症例が認められた。また、一般状態の改善が認められた症例も 1 症例存在した。最終的には腫瘍の再発および転移を認め死亡した症例が 5 症例存在したが、投与期間中の症例犬の QOL は比較的良く保たれ、副作用は認められず、飼い主の印象も良好であった。

本章では何らかの形で原発腫瘍を制御した後、活性化リンパ球の投与を実施したためにこの治療法の腫瘍縮小効果については判断がむずかしいが、活性化リンパ球療法は免疫能の抑制による QOL の低下が起り得る腫瘍罹患症例犬に対する補助療法として、十分適応可能で有用な治療法の一つになり得るものと考えられた。

総 括

従来からの腫瘍治療法の基本である外科手術、放射線療法および化学療法は小動物において効果的である一方、治療自体が副作用を持つことにより生活の質（QOL：Quality of life）を低下させることが多い。したがって、副作用の少ない腫瘍の第4の治療法として、免疫療法の必要性が高まっている。

腫瘍罹患症例は重度の免疫抑制状態に陥っていることが多く、そのために腫瘍を排除する能力が低下している。そのような症例では、原発腫瘍を制御しても容易に免疫機能が回復しないことが推察される。免疫を賦活するためには特異的および非特異的な免疫を誘導する必要があるが、T細胞機能が抑制されている腫瘍罹患症例においては特異的免疫の誘導が困難な場合が多い。その場合には、エフェクター細胞を体外で人為的に作製して移入する受動的免疫療法が適応となる。受動的免疫療法の代表的なものには活性化リンパ球療法があり、一般的に抗 Cluster of differentiation (CD) 3 抗体とインターロイキン (IL; Interleukin) -2 によって活性化されたリンパ球を当該症例に繰り返し投与方法である。活性化されたリンパ球の集団には、主に CD3⁺ の T 細胞とナチュラルキラー

(NK; Natural killer) 細胞が含まれ、これらの細胞によって生体内に特異的および非特異的免疫の両者の誘導が可能であるとされている。小動物においても臨床応用され始めているが、リンパ球の最適な培養法、投与方法および評価方法などは未だに確立されていない。

以上のような背景から本論文では、活性化リンパ球療法の実施方法および評価方法について検討し、さらに腫瘍罹患症例に対して臨床応用してその有効性を評価した。

まず本研究の第1章では、ヒトにおいてNK細胞のマーカーであるとされるCD56に着目し、健常犬の末梢血中におけるCD56⁺細胞の動態を調べることを目的とした。定量ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; Polymerase chain reaction) 法を用いて犬の主要臓器、末梢血単核球 (PBMC; Peripheral blood mononuclear cell) および刺激培養したリンパ球におけるCD56 メッセンジャーリボ核酸 (mRNA; messenger ribonucleic acid) 発現量を相対定量したところ、主要臓器では脳においてCD56 mRNA 発現量が最も高いことが分かった。また刺激培養したリンパ球では、PBMC に比べてCD56 mRNA 発現量が増加した。In situ ハイブリダイゼーション法によりPBMC および刺激培養したリンパ球でのCD56 mRNA の局在

を調べたところ、PBMC ではごくわずかであった CD56 mRNA のシグナルを有する細胞は、刺激培養したリンパ球では増加した。以上のことから、健常犬のリンパ球における CD56 mRNA 発現量および発現細胞数はヒトと比べるとかなり少ないものの、活性化刺激で発現が増加することが判明した。

次いで第 2 章では、犬における活性化リンパ球の繰り返し投与の適応について調べるため、健常犬の PBMC を抗 CD3 抗体と IL-2 を用いて刺激培養し、IL-2 とインターフェロン (IFN ; Interferon) - α により再活性化した細胞についてその性状を解析した。その結果、得られた細胞では CD4⁺CD8⁻細胞比および CD4⁻CD8⁺細胞比の増加、細胞傷害能力の上昇および CD56 mRNA 発現量増加が認められ、活性化されたリンパ球であることが判明した。さらに、体外で活性化されたリンパ球を健常犬に繰り返し投与した際の生体反応について調べた結果、PBMC の構成細胞比の変化および血清 IFN- γ 濃度の上昇が認められたため、健常犬において細胞性免疫応答が活性化された可能性が示唆された。また、特に副作用と思われる反応は認められなかった。以上のことから、健常犬において、活性化されたリンパ球の誘導が可能であること、およびその活性化リンパ球を繰り返し投与することにより免疫応答を活性化できることが示唆された。

第 3 章では、第 2 章で検討した活性化リンパ球の繰り返し投与を、北海道大学大学院獣医学研究科附属動物病院に来院した悪性腫瘍罹患犬 10 症例に対して補助療法として実施した。腫瘍罹患症例においても 14 日間の培養により、活性化されたリンパ球の誘導が可能であった。それら活性化されたリンパ球を当該症例に繰り返し投与した結果、PBMC の細胞増殖率の上昇、末梢血 CD4⁺CD8⁻細胞比および CD4⁻CD8⁺細胞比の増加、血清 IFN- γ 濃度の上昇および一般状態が改善した症例が認められた。投与期間中の症例犬の QOL は比較的良く保たれ、副作用は認められず、飼い主の印象も良好であった。そのため、活性化リンパ球療法は免疫能の抑制による QOL の低下が起こり得る腫瘍罹患犬に対する補助療法として十分適応可能で、かつ有効性が期待できるものと考えられた。

以上の結果より、犬の末梢血には CD56⁺細胞が存在し、その細胞はリンパ球に対する活性化刺激により増加することが判明した。そのため、犬における CD56 の相対定量法は活性化リンパ球誘導指標の一つとしての有用性が示唆された。また、PBMC を抗 CD3 抗体と IL-2 を用いて 14 日間培養し、IL-2 と IFN- α により再活性化する方法により、健常犬、腫瘍罹患犬ともに活性化リンパ球の誘導が可能であった。その活性化リンパ球を繰り返し投与する治療法である活

性化リンパ球療法は、腫瘍による免疫抑制状態に陥っていると推察される小動物においても免疫能を改善できる可能性があり、十分適応可能で有用な治療法の一つであろうと考えられた。また末梢血中の $CD4^+CD8^-$ 細胞および $CD4^-CD8^+$ 細胞の構成比や IFN- γ 濃度を測定することでこの治療に対する反応が評価できる可能性が考えられた。

引用文献

1. Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H. and Roark, J. H. 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 535-562.
2. Blackwood, L. and Dobson, J. M. 1996. Radiotherapy of oral malignant melanoma in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209: 98-102.
3. Bonkobara, M., Sato, T., Takahashi, N., Kasahara, Y., Yagihara, H., Tamura, K., Isotani, M., Azakami, D., Ono, K. and Washizu, T. 2005. Characterization of cDNA and the genomic sequence encoding canine neural-cell adhesion molecule, CD56/N-CAM. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 107: 171-176.
4. Boyum, A. 1968. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 97: 7.
5. Callan, M. F., Fazou, C., Yang, H., Rostron, T., Poon, K., Hatton, C. and McMichael, A. J. 2000. CD8⁺ T-cell selection, function, and death in the primary immune response *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 106: 1251-1261.
6. Chabner, B. A. and Myers, C. E. 1993. Antitumor antibiotics. pp. 374-384. *In: Cancer: principles and practice of oncology.* 4th ed. J. B. Lippincott, Philadelphia.
7. Chen, L. K., Tourvieille, B., Burns, G. F., Bach, F. H., Mathieu-Mahul, D., Sasportes, M. and Bensussan, A. 1986. Interferon: a cytotoxic T lymphocyte differentiation signal. *Eur. J. Immunol.* 16: 767-770.
8. Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
9. Cohen, G., Haag-Weber, M. and Hörl, W. H. 1997. Immune dysfunction in uremia. *Kidney Int. Suppl.* 62: 79-82.
10. Cohavy, O. and Targan, S. R. 2007. CD56 marks an effector T cell subset in the human intestine. *J. Immunol.* 178: 5524-5532.
11. Craig, L. E. 2001. Cause of death in dogs according to breed: a necropsy survey of five breeds. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 37: 438-443.
12. Ebina, T., Fujimiya, Y., Yamaguchi, T., Ogama, N., Sasaki, H., Isono, N., Suzuki, Y., Katakura, R., Tanaka, K., Nagata, K., Takano, S., Tamura, K., Uno, K. and Kishida, T. 1998. The use of BRM-activated killer cells in adoptive

- immunotherapy: a pilot study with nine advanced cancer patients. *Biotherapy* 11: 241-253.
13. Ebina, T., Ogama, N., Shimanuki, H., Kubota, T. and Isono, N. 2001. Effector mechanism and clinical response of BAK (BRM-Activated Killer) immuno-cell therapy for maintaining satisfactory QOL of advanced cancer patients utilizing CD56-positive NIE (neuro-immune-endocrine) cells. *Microbiol. Immunol.* 45: 403-411.
 14. Ebina, T., Ogama, N., Shimanuki, H., Kubota, T. and Isono, N. 2003. Life-prolonging effect of immunocell BAK (BRM-activated killer) therapy for advanced solid cancer patients: prognostic significance of serum immunosuppressive acidic protein levels. *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 555-560.
 15. Farag, S. S. and Caligiuri, M. A. 2006. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* 20: 123-137.
 16. Filiz, S, Dalcik, C, Filiz, T. M. and Dalcik, H. 2003. Localization of neural cell adhesion molecule and pan-cadherin immunoreactivity in intrauterine growth-retarded newborn rat kidneys. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 11: 352-358.
 17. Filiz, S., Dalcik, H., Yardimoglu, M., Gonca, S. and Ceylan, S. 2002. Localization of neural cell adhesion molecule (N-CAM) immunoreactivity in adult rat tissues. *Biotech. Histochem.* 77: 127-135.
 18. 藤原大美. 2003. 抗腫瘍免疫の誘導増強と腫瘍の免疫療法. pp. 238-273. 腫瘍免疫学. 藤原大美. 中外医学社. 東京.
 19. Funk, J., Schmitz, G., Bach, U., Failing, K. and Burkhardt, E. 2003. Influence of different tumour types on natural cytotoxicity (NK cell activity) and mitogen-induced lymphocyte proliferation in isolated blood lymphocytes from 110 dogs with tumours. *Res. Vet. Sci.* 74: 129-135.
 20. Gondolf, C., Burkhardt, E., Failing, K. and Stitz, L. 1996. A new colorimetric method for measuring cell-mediated cytotoxicity in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 55: 11-22.
 21. Grimm, E. A. 1986. Human lymphokine-activated killer cells (LAK cells) as a potential immunotherapeutic modality. *Biochim. Biophys. Acta.* 865: 267-279.
 22. Grimm, E. A., Robb, R. J., Roth, J. A., Neckers, L. M., Lachman, L. B., Wilson, D.

- J. and Rosenberg, S. A. 1983. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. *J. Exp. Med.* 158: 1356-1361.
23. Henkart, P. A. 1994. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity* 1: 343-346.
 24. Hercend, T., Griffin, J. D., Bensussan, A., Schmidt, R. E., Edson, M. A., Brennan, A., Murray, C., Daley, J. F., Schlossman, S. F. and Ritz, J. 1985. Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 75: 932-943.
 25. Hoshino, Y., Tajima, M., Takagi, S., Osaki, T., Okumura, M. and Fujinaga, T. 2008. Relative quantification of canine *CD56* mRNA expression by real-time polymerase chain reaction method in normal tissues and activated lymphocyte. *J. Vet. Med. Sci.*, 70: 309-312.
 26. Hoshino, Y., Takagi, S., Osaki, T., Okumura, M. and Fujinaga, T. 2008. Phenotypic analysis and effects of sequential administration of activated canine lymphocytes on healthy beagles. *J. Vet. Med. Sci.* (in press)
 27. Inoue, K., Ohashi, E., Kadosawa, T., Hong, S. H., Matsunaga, S., Mochizuki, M., Nishimura, R. and Sasaki, N. 2004. Establishment and characterization of four canine melanoma cell lines. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 1437-1440.
 28. Ioannides, C. G., and Whiteside T. L. 1993. T cell recognition of human tumors: implications for molecular immunotherapy of cancer. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 66: 91-106.
 29. Itoh, H., Kakuta, T., Kudo, T., Sakonju, I., Hohdatsu, T., Ebina, T. and Takase, K. 2003. Bulk cultures of canine peripheral blood lymphocytes with solid phase anti-CD3 antibody and recombinant interleukin-2 for use in immunotherapy. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 329-333.
 30. Kaetzke, A., Jentzsch, D. and Eschrich, K. 2005. Quantification of *Microthrix parvicella* in activated sludge bacterial communities by real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 40: 207-211.
 31. Kent, M. S., Strom, A., London, C. A. and Seguin, B. 2004. Alternating carboplatin and doxorubicin as adjunctive chemotherapy to amputation or limb-sparing surgery in the treatment of appendicular osteosarcoma in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 18:

- 540-544.
32. Kimura, T., Hasebe, R., Mukaiya, R., Ochiai, K., Wada, R. and Umemura, T. 2004. Decreased expression of equine herpesvirus-1 early and late genes in the placenta of naturally aborted equine fetuses. *J. Comp. Pathol.* 130: 41-47.
 33. Kol, R., Friedlander, M., Riklis, E. and Raveh, D. 1983. Separation of human lymphocytes on Ficoll-Paque gradients: stimulation of cells and depletion of a concanavalin-A responsive radioresistant subpopulation. *Radiat. Res.* 95: 108-115.
 34. Kozasa, T., Tajima, M., Yasutomi, I., Sano, K., Ohashi, K. and Onuma, M. 2005. Relationship of bovine viral diarrhea virus persistent infection to incidence of diseases on dairy farms based on bulk tank milk test by RT-PCR. *Vet. Microbiol.* 106: 41-47.
 35. Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R. and Phillips, J. H. 1986. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 136: 4480-4486.
 36. Lazda, V. A. and Baram, P. 1979. In vitro stimulation of natural killer (NK) cells by soluble factor(s) generated in antigen-stimulated rhesus monkey peripheral blood lymphocyte cultures. *J. Immunol.* 122: 2068-2073.
 37. Mocikat, R., Braumüller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmüller, G., Koszinowski, U. and Röcken, M. 2003. Natural killer cells activated by MHC class I (low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 19: 561-569.
 38. Moore, S. E., Thompson, J., Kirkness, V., Dickson, J. G. and Walsh, F. S. 1987. Skeletal muscle neural cell adhesion molecule (N-CAM): changes in protein and mRNA species during myogenesis of muscle cell lines. *J. Cell Biol.* 105: 1377-1386.
 39. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348-2357.
 40. Musha, N., Yoshida, Y., Sugahara, S., Yamagiwa, S., Koya, T., Watanabe, H., Hatakeyama, K. and Abo, T. 1998. Expansion of CD56⁺ NK T and gamma delta T cells from cord blood of human neonates. *Clin. Exp. Immunol.* 113: 220-228.
 41. Nagata, T., Zou, J. P., Yamamoto, N., Ono, S., Fujiwara, H. and Hamaoka, T. 1993.

- Suppression of anti-tumor CD4⁺ T cell responsiveness in the tumor-bearing state and its recovery in *in vitro* culture free of tumor burden. *Jpn. J. Cancer Res.* 84: 1181-1189.
42. Nishimura, T., Nakamura, Y., Takeuchi, Y., Tokuda, Y., Iwasawa, M., Kawasaki, A., Okumura, K. and Habu, S. 1992. Generation propagation, and targeting of human CD4⁺ helper/killer T cells induced by anti-CD3 monoclonal antibody plus recombinant IL-2. An efficient strategy for adoptive tumor immunotherapy. *J. Immunol.* 148: 285-291.
 43. Nowell, P. C. 1960. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20: 462-466.
 44. Otani, I., Niwa, T., Tajima, M., Ishikawa, A., Watanabe, T., Tsumagari, S., Takeishi, M. and Kanayama, K. 2002. CD56 is expressed exclusively on CD3⁺ T lymphocytes in canine peripheral blood. *J. Vet. Med. Sci.* 64: 441-444.
 45. Reed, E. 1993. Platinum analogs. pp. 390-400. *In: Cancer: principles and practice of oncology.* 4th ed. J. B. Lippincott, Philadelphia.
 46. Reinherz, E. L. and Schlossman, S. F. 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 19: 821-827.
 47. Roussel, E., Gerrard, J. M. and Greenberg, A. H. 1990. Long-term cultures of human peripheral blood lymphocytes with recombinant human interleukin-2 generate a population of virtually pure CD3⁺ CD16⁻ CD56⁻ large granular lymphocyte LAK cells. *Clin. Exp. Immunol.* 82: 416-421.
 48. Rutishauser, U. 1996. Polysialic acid and the regulation of cell interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 679-684.
 49. Salvadori, S., Martinelli, G. and Zier, K. 2000. Resection of solid tumors reverses T cell defects and restores protective immunity. *J. Immunol.* 164: 2214-2220.
 50. Sato, K., Ohtsuka, K., Hasegawa, K., Yamagiwa, S., Watanabe, H., Asakura, H. and Abo, T. 1995. Evidence for extrathymic generation of intermediate T cell receptor cells in the liver revealed in thymectomized, irradiated mice subjected to bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* 182: 759-767.
 51. Scott, P. and Trinchieri, G. 1995. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 34-40.
 52. 反町典子、小安重夫、烏山一 2001. NK 細胞の標的識別とウイルスのエスケ

ープ機構. 実験医学 19 : 614-620.

53. Tada, T., Sano, H., Sato, S., Shima, J., Fujiwara, H. and Hamaoka, T. 1990. Immune dysfunction expressed selectively on L3T4⁺ T cells in the tumor-bearing state. *J. Leukoc. Biol.* 47: 149-157.
54. Takahashi, T., Chiba, S., Nieda, M., Azuma, T., Ishihara, S., Shibata, Y., Juji, T. and Hirai, H. 2002. Cutting edge: analysis of human V alpha 24⁺CD8⁺ NK T cells activated by alpha-galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 168: 3140-3144.
55. Takahashi, E., Kuranaga, N., Satoh, K., Habu, Y., Shinomiya, N., Asano, T., Seki, S. and Hayakawa, M. 2006. Induction of CD16⁺ CD56^{bright} NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16⁻ CD56^{bright} NK Cells but also from CD16⁻ CD56^{dim} NK cells. *Scand. J. Immunol.* 65: 126-138.
56. Takayama, T., Sekine, T., Makuuchi, M., Yamasaki, S., Kosuge, T., Yamamoto, J., Shimada, K., Sakamoto, M., Hirohashi, S., Ohashi, Y. and Kakizoe, T. 2000. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 356: 802-807.
57. Tennant, J. R. 1964. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation* 2: 685-694.
58. Thiery, J. P., Duband, J. L., Rutishauser, U. and Edelman, G. M. 1982. Cell adhesion molecules in early chicken embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 6737-6741.
59. von Boehmer, H. and Fehling, H. J. 1997. Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 433-452.
60. Wang, B., Fujisawa, H., Zhuang, L., Freed, I., Howell, B. G., Shahid, S., Shivji, G. M., Mak, T. W. and Sauder, D. N. 2000. CD4⁺ Th1 and CD8⁺ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. *J. Immunol.* 165: 6783-6790.
61. Wang, F. S., Liu, M. X., Zhang, B., Shi, M., Lei, Z. Y., Sun, W. B., Du, Q. Y. and Chen, J. M. 2002. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *World J. Gastroenterol.* 8: 464-468.
62. Withrow, S. J. and MacEwen, E. G. 1989. Why worry about cancer in pet animals? pp. 1-3. *In: Small animal clinical oncology*, 2nd ed., W. B. Saunders, Philadelphia.

63. Wolfesberger, B., Hoelzl, C., Walter, I., Reider, G. A., Fertl, G., Thalhammer, J. G., Skalicky, M. and Egerbacher, M. 2006. *In vitro* effects of meloxicam with or without doxorubicin on canine osteosarcoma cells. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 29: 15-23.
64. Yamamoto, N., Zou, J. P., Li, X. F., Takenaka, H., Noda, S., Fujii, T., Ono, S., Kobayashi, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Fujiwara, H. and Hamaoka, T. 1995. Regulatory mechanisms for production of IFN- γ and TNF by antitumor T cells or macrophages in the tumor-bearing state. *J. Immunol.* 154: 2281-2290.
65. Yokoyama, W. M. and Seaman, W. E. 1993. The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 613-635.
66. Zou, J. P., Nagata, T., Yamamoto, N., Ono, S., Fujiwara, H. and Hamaoka, T. 1992. Tumor-bearing mice exhibit a progressive increase in tumor antigen-presenting cell function and a reciprocal decrease in tumor antigen-responsive CD4⁺ T cell activity. *J. Immunol.* 148: 648-655.
67. Zou, J. P., Shimizu, J., Ikegami, K., Yamamoto, N., Ono, S., Fujiwara, H. and Hamaoka, T. 1994. Recovery of antitumor CD4⁺ T cell responsiveness, suppressed in the tumor-bearing state, by release from tumor burden. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120: 279-285.

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇切なるご指導を賜りました北海道大学大学院獣医学研究科獣医外科学教室の藤永 徹教授、奥村正裕准教授および高木 哲助教に深く感謝致します。また、ご校閲の労をとられ、実験手技について終始懇切なる指導をいただき本実験遂行上必要な実験器具を快く使用させていただいた同研究科附属動物病院の田島誉士准教授に深謝致します。ならびに本論文をご校閲いただいた同臨床分子生物学教室稲葉 睦教授に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、実験手技について終始懇切なる指導をいただき、本実験遂行上必要な実験器具および実験材料を快く使用させていただいた人獣共通感染症リサーチセンター分子病態・診断部門の木村享史准教授に深謝致します。

本研究遂行にあたり多大なご指導をしていただきました北海道大学大学院獣医学研究科附属動物病院の大崎智弘助教に感謝致します。また、日々の診療および研究のなか、終始甚大なる協力を惜しまれなかった同研究科獣医外科学教室の教室員各位に感謝致します。

大学院に進学するにあたり様々なご助言をいただきました中川獣医科病院院長中川秀樹先生に深謝致します。また、博士号取得という目標に共感して下さり、叱咤激励して下さった高橋動物病院院長高橋 徹先生ならびに病院スタッフ各位に深謝致します。

最後に本研究のために尊い命を捧げてくれた実験犬および治療の甲斐無く亡くなった症例犬に心から感謝すると共に冥福を祈ります。

A basic study on clinical application of canine antitumor immunotherapy using activated lymphocytes

Yuki HOSHINO

*Laboratory of Veterinary Surgery
Department of Veterinary Clinical Sciences
Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University
Sapporo 060-0818, Japan*

Conventional tumor therapy, including surgery, radiotherapy, and chemotherapy, effectively prolongs the survival time of tumor-bearing patients. However, critical adverse effects frequently occur during conventional tumor therapy, disturbing the quality of life (QOL) of these patients. Immunotherapy is therefore expected to be an alternative therapy for accelerating antitumor immunity, while inducing less adverse effects.

In tumor-bearing animals, the activation of spontaneous cellular immunity to tumorous tissue is relatively limited, and this suppression of immune function is not easily compensated even after the removal of the tumor mass. The induction of both specific and nonspecific immunity, especially T cell function, is imperative for the activation of antitumor immunity, which is suppressed in tumor-bearing animals. Passive immunotherapy by administration of artificially proliferated effector cells that are activated *ex vivo* is considered to be applicable for these immunosuppressed animals. Activated lymphocyte therapy is a type of passive immunotherapy; it involves sequential administration of autologous lymphocytes stimulated and cultured with anti-cluster of differentiation (CD)-3 antibody and human recombinant (hr) interleukin (IL)-2. The majority of these cultured cells are speculated to be CD3⁺ T cells and

natural killer (NK) cells, which can induce both specific and nonspecific immunity against the tumor mass. It is essential to determine the optimum conditions for lymphocyte culture and cell administration and to evaluate this method, which is not yet well established.

The purpose of the present study was to establish the methodology for the administration of activated lymphocyte therapy in tumor-bearing dogs and to evaluate this therapy.

In the first part of this study, the dynamics of canine CD56⁺ cells in peripheral blood collected from healthy beagles were investigated. CD56 is considered to be one of the markers for NK cells in human beings; thus, canine CD56 is expected to be a candidate marker for canine NK cells. Quantitative polymerase chain reaction (PCR) method was used to determine canine CD56 messenger ribonucleic acid (mRNA) expression in normal tissues, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and stimulated lymphocytes. The highest CD56 mRNA expression was observed in the brain. The CD56 mRNA expression in stimulated lymphocytes was higher than that in PBMCs. To localize CD56 mRNA, *in situ* hybridization was performed. The number of CD56⁺ cells of stimulated lymphocytes was extremely higher than that of PBMCs. CD56 mRNA expression in canine lymphocytes was considerably lower; most lymphocytes were CD56⁻. However, in the lymphocytes activated by stimulated PBMCs, both the CD56 mRNA expression and the number of CD56⁺ cells increased.

In the second part of the study, PBMCs collected from clinically healthy dogs were activated using anti-CD3 antibody and hr IL-2 and reactivated using hr interferon (IFN)- α and IL-2. The properties of the cells thus obtained were analyzed in order to investigate the adaptation of canine activated lymphocyte therapy. In the obtained cells, the proportion of CD4⁺CD8⁻ cells and CD4⁻CD8⁺ cells was significantly increased; the

cytotoxicity of the cultured cells was reinforced; and CD56 mRNA levels tended to be increased. These cells were confirmed to be activated lymphocytes. Furthermore, we investigated the effects of sequential administration of these cells in healthy dogs. This sequential administration was shown to increase the cell proliferative activity of PBMCs, the proportions of CD4⁺CD8⁻ cells and CD4⁻CD8⁺ cells, and the serum IFN- γ concentration; no severe adverse effects were observed. We concluded that activated lymphocytes could be administered to healthy dogs, and sequential administration of these cells reinforced the recipient's immunity.

In the third part of the study, autogenous activated lymphocytes, which were activated in the second part of the study, were sequentially administered as an adjuvant antitumor therapy to 10 dogs with spontaneous malignant tumors, in Veterinary Teaching Hospital of Hokkaido University. Peripheral blood lymphocytes from tumor-bearing dogs were proliferated and activated for 14 days in culture. After sequential administration of these activated lymphocytes, the proliferation activities of PBMCs, proportions of CD4⁺CD8⁻ cells and CD4⁻CD8⁺ cells, and serum IFN- γ concentration increased in some cases. The general conditions of all 10 patients remained stable, and the patients were comfortable during the entire period of lymphocyte administration. The owners of these dogs considered this new concept of antitumor therapy acceptable. This shows that the QOL of these tumor-bearing dogs was maintained in a relatively favorable state, with no evidence of any adverse effects. Activated lymphocyte therapy was therefore thought to be applicable and effective as an adjuvant antitumor therapy; moreover, it maintained the QOL in immunosuppressed tumor-bearing dogs.

In conclusion, CD56⁺ cells existed in canine peripheral blood, and these cells proliferated during the process of activation to lymphocytes. Expression of canine

CD56 mRNA possibly indicates the activation of lymphocytes. The conditions of activation of lymphocytes were then optimized, using anti-canine CD3 antibody, hr IL-2, and hr IFN- α in healthy and tumor-bearing dogs. Sequential administration of these activated lymphocytes was an applicable and effective therapy for tumor-bearing small animals with immunosuppression induced by malignant tumors.