

称号及び氏名	博士（獣医学）	三重 慧一郎
学位授与の日付	平成28年2月29日	
論文名	Effects of adoptive immunotherapy using lymphokine-activated T killer cells on peripheral blood lymphocytes of tumor-bearing dogs (腫瘍性疾患犬の末梢血リンパ球における活性化自己リンパ球療法の効果に関する研究)	
論文審査委員	主査	大橋 文人
	副査	笹井 和美
	副査	嶋田 照雅
	副査	秋吉 秀保

論文要旨

緒言

腫瘍性疾患の進行は免疫応答と密接に関連しており、**T** リンパ球を中心とする適応免疫応答の変化は腫瘍性疾患の進行や治療成績に大きく関わると考えられている。腫瘍細胞は様々なサイトカインなどの免疫作用物質を分泌することで**T** リンパ球の数や機能を修飾し、その結果、特に細胞性免疫応答を抑制することが報告されている。細胞性免疫応答の抑制は腫瘍性疾患の進行や転移を促進させるため、腫瘍性疾患において細胞性免疫応答の抑制は大きな問題となる。

近年、腫瘍性疾患に対する新しい治療法として、生体の免疫応答を利用して抗腫瘍効果をもたらす免疫療法が注目されている。免疫療法のひとつである活性化自己リンパ球 (**T lymphokine activated killer cells; T-LAK**) 療法は、症例自身のリンパ球を体外でサイトカインなどにより活性化してから再び体内に戻す治療法であり、体内の免疫抑制物質の影響を受けることなく効率的に**T** リンパ球を活性化できることが利点である。**T-LAK** 療法は、人医療において、肝細胞癌や肺癌の術後の再発予防や予後の改善といった抗腫瘍効果とともに、腫瘍性疾患により抑制された末梢血リンパ球の数や機能を改善すると報告されている。獣医療においても、主に腫瘍性疾患犬を対象として**T-LAK** 療法が実施され

ているが、**T-LAK** 療法による免疫応答の変化については十分検討されていない。そこで本研究では、**T-LAK** 療法が腫瘍性疾患犬の免疫応答に与える効果を明らかにするために、**T-LAK** 療法が末梢血リンパ球の数と機能に与える影響について検討した。

第1章 **T-LAK** 療法を実施した腫瘍性疾患犬における末梢血リンパ球数の変化と1年生存率

T-LAK 療法による末梢血リンパ球数の変化と予後の関連を明らかにするために、**2012** 年から **2014** 年に大阪府立大学獣医臨床センターを受診し **T-LAK** 療法を受けた腫瘍性疾患犬のうち生存期間が明らかである **24** 例（悪性黒色腫 **6** 例、甲状腺癌 **4** 例、肺腺癌 **3** 例、肝細胞癌 **2** 例、その他の腫瘍 **9** 例）について、初回 **T-LAK** 投与後に末梢血リンパ球数が増加した症例（増加群、**n=15**）と減少した症例（減少群、**n=9**）の **2** 群に分け、**1** 年生存率を比較した。その結果、増加群は減少群よりも有意に高い **1** 年生存率を示した (**$P<0.05$**)。従って、末梢血リンパ球数の変化は **T-LAK** 療法を受けた腫瘍性疾患犬の予後指標となりうるということが推測され、特に **T-LAK** 療法による末梢血リンパ球数の増加が良好な治療成績を得るうえで重要である可能性が考えられた。

第2章 外科手術後の健常犬の末梢血リンパ球における **T-LAK** 療法の効果

第 **1** 章では、**T-LAK** 療法を実施した腫瘍性疾患犬において末梢血リンパ球数の増加が良好な予後と関連する可能性を示した。人医療では、腫瘍性疾患の術後再発・転移の予防を目的として **T-LAK** 療法を外科手術後に実施することが多く、術後の免疫応答低下を予防する効果も報告されている。しかし、獣医療では外科手術後の **T-LAK** 療法が免疫応答に与える効果については明らかにされていない。そこで第 **2** 章では、開腹手術後の健常犬の末梢血リンパ球における **T-LAK** 療法の効果について検討した。**T-LAK** を投与した犬 (**T-LAK** 群) では、投与していない犬 (対照群) と比較して末梢血好中球数および **CRP** が術後早期に低下する傾向を示した。抗炎症性サイトカインである **IL-4**、**IL-10**、**TGF- β 1 mRNA** 発現については、対照群では術後顕著な変化を認めなかったのに対し、**T-LAK** 群では術後 **7** 日目における **IL-10 mRNA** 発現の有意な上昇を認めた (**$P<0.01$**)。末梢血リンパ球数、**CD3**、**CD4** および **CD8** 陽性細胞数については、対照群では手術直後に減少して術後 **28** 日かけて術前の値まで回復したのに対し、**T-LAK** 群では術後の減少を認めなかった。細胞性免疫応答を活性化するサイトカインである **IL-2 mRNA** 発現は両群ともに術後の減少を認め、その後対照群が術後 **28** 日目で有意な上昇を認めたのに対し、**T-LAK** 群ではより早い術後 **14** 日目に有意な上昇を認めた (**$P<0.05$**)。以上の結果から、開腹手術直後の **T-LAK** 療法は術後の末梢血リンパ球数の減少を防ぐとともに、末梢血リンパ球における **IL-10** 産生を誘導して術後の炎症反応を早期に収束し、**IL-2** 産生をより早く回復させると推測された。

第3章 腫瘍切除と T-LAK 療法を併用した犬における末梢血リンパ球の変化

第2章では、健常犬において外科手術後の T-LAK 投与は術後の末梢血リンパ球数減少を防ぐとともに、抗炎症性サイトカイン産生を調節し炎症反応を早期に収束させることで術後抑制された細胞性免疫応答の活性化を早める可能性を示した。そこで第3章では、外科手術を受けた腫瘍性疾患犬において T-LAK 療法が末梢血リンパ球に与える影響を明らかにするために、腫瘍の姑息的切除と T-LAK 療法を併用した犬における末梢血リンパ球の数および機能の変化について検討した。

まず、腫瘍の姑息的切除と T-LAK 療法を併用した犬 14 例（悪性黒色腫 7 例、甲状腺癌 3 例、その他の腫瘍 4 例）について、初回 T-LAK 投与前後の末梢血リンパ球数および T リンパ球サブセット細胞数を比較した。末梢血リンパ球数、CD3、CD4 および CD8 陽性細胞数は T-LAK 投与後に増加傾向を示した。特に末梢血 CD8 陽性細胞数は T-LAK 投与後有意な増加を示し ($P<0.05$)、末梢血 CD4/CD8 比は投与後低下傾向を示した。

続いて、腫瘍の姑息的切除後に T-LAK を 5 回以上投与した 8 例（悪性黒色腫 3 例、肝細胞癌 2 例、甲状腺癌 2 例、軟部組織肉腫 1 例）について、5 回目投与までの末梢血リンパ球数および T リンパ球サブセット細胞数の変化を検討した。末梢血リンパ球数は初回投与後増加傾向を示し、2 回目以降は投与前に近い値を維持した。CD3 および CD4 陽性細胞数は 4 回目投与後を除いて高値を維持する傾向を示した。CD8 陽性細胞数は 2 回目投与後まで有意な高値を示し ($P<0.05$)、3 回目投与後以降は減少したものの、投与前よりも高値を維持する傾向を示した。CD4/CD8 比は 5 回目投与後まで投与前よりも低値を維持する傾向を示した。以上の結果から、腫瘍の姑息的切除と T-LAK の複数回投与を併用することで、末梢血 T リンパ球サブセット細胞数、特に CD8 陽性細胞数の高値を維持できると推測された。

さらに、腫瘍の姑息的切除後に T-LAK 療法を実施した 4 例（肝細胞癌、甲状腺癌、線維肉腫、悪性黒色腫各 1 例）について、初回 T-LAK 投与前後の末梢血単核球における IL-2 および IL-10 mRNA 発現を比較した。IL-2 mRNA 発現は 4 例中 2 例で投与後上昇し、残る 2 例で投与後低下した。IL-10 mRNA 発現は 1 例で投与後上昇、3 例で投与後低下した。末梢血リンパ球数および T リンパ球サブセット細胞数は 4 例すべてで T-LAK 投与後増加した。以上の結果から、腫瘍の姑息的切除後の T-LAK 投与による末梢血単核球の IL-2 および IL-10 mRNA 発現の変化は末梢血リンパ球数の増加と関連しない可能性があると考えられた。

顕著な変化を示した CD8 陽性細胞について、初回 T-LAK 投与後の増加率の中央値 (1.7) を基準として予後が明らかな 12 例を高増加群 ($1.7 \leq$, $n=6$) と低増加群 (<1.7 , $n=6$) の 2 群に分け、1 年生存率を比較した。その結果、高増加群は低増加群よりも有意に高い 1 年生存率を示した ($P<0.05$)。従って、CD8 陽性細胞の増加は腫瘍性疾患犬において術後 T-LAK 療法により良好な治療成績を得るために重要であると推測された。

まとめ

1. 腫瘍性疾患犬において、初回 **T-LAK** 投与後の末梢血リンパ球数の増加は良好な予後と関連すると推測された。
2. 手術と **T-LAK** 療法の併用は術後の末梢血リンパ球数の減少を防ぐとともに、末梢血リンパ球における抗炎症性サイトカイン産生を誘導して術後の炎症反応を早期に収束し、**IL-2** 産生をより早く活性化させると推測された。
3. 腫瘍切除と **T-LAK** 療法の併用は末梢血リンパ球数および **T** リンパ球サブセット細胞数、特に **CD8** 陽性細胞数を高めると推測された。**T-LAK** 療法による末梢血リンパ球数の増加は末梢血単核球の **IL-2** および **IL-10 mRNA** 発現の変化と関連しない可能性があると考えられた。**CD8** 陽性細胞の増加は腫瘍性疾患犬において術後 **T-LAK** 療法により良好な予後を得るために重要であると推測された。

審査結果の要旨

腫瘍細胞は **T** リンパ球の数や機能を修飾して細胞性免疫応答を抑制し、その結果腫瘍性疾患の進行や転移は促進する。腫瘍に対する免疫療法のひとつである活性化自己リンパ球 (**T-LAK**) 療法は、症例自身のリンパ球を体外でサイトカインなどにより活性化してから再び体内に戻す治療法であり、人医療では抗腫瘍効果とともに腫瘍細胞により抑制された細胞性免疫応答を改善することが報告されている。獣医療においても、主に腫瘍性疾患犬を対象として **T-LAK** 療法が実施されているが、その免疫学的効果は十分検討されていない。本研究では、**T-LAK** 療法が腫瘍性疾患犬の免疫応答に与える効果を明らかにすることを目的として、試験供試犬および臨床例による試験を行い、下記の結果を得た。

第 1 章では、**T-LAK** 療法による末梢血リンパ球数の変化と予後の関連を明らかにするために、**T-LAK** 療法を受けた腫瘍性疾患犬 24 例（悪性黒色腫 6 例、甲状腺癌 4 例、肺腺癌 3 例、肝細胞癌 2 例、その他の腫瘍 9 例）について、初回 **T-LAK** 投与後に末梢血リンパ球数が増加した症例（増加群、**n=15**）と減少した症例（減少群、**n=9**）の 2 群に分け、1 年生存率を比較した。その結果、**T-LAK** 療法による末梢血リンパ球の増加は良好な予後を得るうえで重要であることを明らかにした。

第 2 章では、外科手術と **T-LAK** 療法の併用が免疫応答に与える影響を明らかにするために、健常ビーグル犬 10 頭に開腹手術を実施し、手術直後に **T-LAK** を投与した犬 (**T-LAK** 群、**n=5**) と投与していない犬 (対照群、**n=5**) の炎症反応および末梢血リンパ球の数とサイトカイン **mRNA** 発現を比較した。その結果、

術後の **T-LAK** 療法は手術侵襲による末梢血リンパ球数の減少を防ぐとともに、抗炎症性サイトカイン (**IL-10**) 産生を誘導し術後炎症反応を早期に収束させることで、細胞性免疫応答を活性化するサイトカイン (**IL-2**) の早期産生を促すことを明らかにした。

第 3 章では、外科手術と **T-LAK** 療法の併用が腫瘍性疾患犬の免疫応答に与える影響を明らかにするために、腫瘍の姑息的切除と **T-LAK** 療法を受けた犬における末梢血リンパ球の数およびサイトカイン **mRNA** 発現の変化について検討した。その結果、腫瘍切除手術と **T-LAK** 療法の併用は末梢血リンパ球数、特に **CD8** 陽性細胞数を増加させることを明らかにした。さらに、末梢血 **CD8** 陽性細胞について、初回 **T-LAK** 投与後の増加率の中央値 (**1.7**) を基準として、腫瘍切除手術と **T-LAK** 療法を併用した犬 **12** 例を高増加群 (**1.7** ≤、 **n=6**) と低増加群 (**<1.7**、 **n=6**) の 2 群に分け、**1** 年生存率を比較した。その結果、術後 **T-LAK** 療法による末梢血 **CD8** 陽性細胞の増加は良好な予後を得るうえで重要であることを明らかにした。

本研究は、腫瘍性疾患犬の **T-LAK** 療法における末梢血リンパ球の変化の重要性を示唆するとともに、**T-LAK** 療法により外科手術後の細胞性免疫応答や炎症反応が改善されうることを明らかにした。これらの成績は、臨床獣医学、腫瘍学、ならびに免疫学に大きく貢献するものと評価する。

本論文の審査および最終試験の結果と併せて、博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。