

肝細胞癌に対する新しい治療戦略の開発に関する研究

——担癌患者の免疫抑制状態の改善をめざした免疫学的治療——

飯塚 秀彦, 山本 正之, 松本 由朗

山梨医科大学第1外科

抄 録：進行肝細胞癌患者の新しい治療法の確立をめざし、lymphokine activated killer cells (LAK) 療法ならびに interleukin-2 (IL-2) の持続肝動脈内注入療法 (持続肝動注療法) の有用性を検討した。

I. LAK 療法：3例の男性の肝細胞癌患者を対象とし、肝動脈内留置カテーテルから、LAK 細胞を、それぞれ 1.0×10^8 , 2.8×10^8 , 3.5×10^8 個投与し、さらに8時間毎に IL-2 3.8×10^5 JRU を3回投与した。しかし、全例が腫瘍の進行 (PD) を示し、肝硬変を合併した進行肝細胞癌患者に対する LAK 療法には限界があると考えられた。

II. Adriamycin-Lipiodol emulsion (ADR-Lip) の間歇投与を併用した IL-2 持続肝動脈内注入療法：進行肝細胞癌患者 24 例を対象とし、IL-2 (S-6820, 塩野義製薬, 大阪) の持続肝動注療法と ADR-Lip の間歇的投与を 17 例 (A 群) に、ADR-Lip の間歇投与のみを 7 例 (B 群) に施行した。抗腫瘍効果は A 群で著効 (CR) 4 例, 有効 (PR) 2 例で奏効率は 35.3%, B 群では PR 2 例で奏効率は 28.6% であり、奏効率, CR 率ともに有意差はなかった。また、両群の累積生存率に有意差を認めなかった。一方、末梢血 NK 活性は治療開始 4-5 か月後には A 群で $53.1 \pm 13.8\%$ と増強し、B 群に比べて有意に高値となり、この時期に抗腫瘍効果を得た。しかし、8-9 か月後には低下し、有意差は認められなくなった。同様に、A 群においては末梢血 IL-2 receptor 陽性細胞の割合および末梢血 LAK 活性は 4-5 か月後には増強し、8-9 か月後には低下した。

進行肝細胞癌患者に対する補助免疫療法における奏効率, 累積生存率の改善には、末梢血 NK 活性, 末梢血 IL-2 receptor 陽性細胞の割合, 末梢血 LAK 活性を長期にわたり高値に保つ治療法の開発が必要である。

キーワード 進行肝細胞癌, インターロイキン 2, 養子免疫療法, NK 活性, 動注免疫化学療法

はじめに

本邦の肝細胞癌 (肝癌) の大部分は、B 型や C 型肝炎ウイルスによる、肝炎後の慢性肝疾患を背景として発生する。そのため、肝機能障害と、それに起因する各臓器の機能異常により、

たとえ小さな腫瘍であっても肝臓の機能によっては開腹困難な症例が存在する。そこで現在、肝癌に対する治療法として、肝切除術の他に、動脈塞栓療法 (TAE), ethanol 注入療法 (EI), microwave 焼灼療法 (MTC) および動脈内抗癌剤注入化学療法 (TAI) など、極めて有用な方法が開発され、これらの併用療法によって優れた治療成績が得られるようになった。

著者らは、肝癌治療に際してのこれらの問題

点のうち、肝癌患者の免疫能について検討を続けており、腫瘍に対する非特異的免疫の重要な位置を占める末梢血NK活性は肝癌患者では腫瘍の進行度よりも肝予備能に大きく影響を受けていることを報告している¹⁾。

そこで、低下した宿主の免疫能を高め、直接的な抗腫瘍効果と、肝細胞癌に多い多中心性発癌や転移・再発を抑制し長期生存をはかることを目的として補助免疫療法を検討した。まず、補助免疫療法のうち養子免疫療法である lymphokine activated killer cells (LAK) 療法に着目し、効率的なLAK細胞の誘導法について検討²⁾した。今回その基礎的データの蓄積に基づいて実際にLAK療法を行い、その臨床成績について検討した。また、さらに有効な免疫療法の開発をめざして interleukin-2 (IL-2) の肝動脈内投与による宿主免疫能の高揚と、腫瘍局所の腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の活性化を計る方法に研究を進め、その臨床成績を検討した。

I. 進行肝細胞癌患者に対するLAK療法の検討 [対象と方法]

3例の進行肝細胞癌患者 (Stage IV-A 2例, Stage IV-B 1例) に肝切除術後、LAK療法を施行した。LAK細胞は、末梢血リンパ球を leucocyte apheresis にて採取し、著者らが既に報告した方法²⁾によって至適条件を設定し、細胞濃度 2×10^6 /ml, IL-2 濃度 3420JRU/ml で

ABO 適合同種血漿にて3日間静置培養し採集した。IL-2はTGP-3 (武田薬品) を、培地はRPMI 1640 (Gibco) を使用した。投与方法および経路は肺への集積を避けるため先端を肝動脈内に留置した catheter を経由して、それぞれ 3.5×10^8 , 2.8×10^8 , 1.0×10^8 個のLAK細胞を投与した。さらに 3.8×10^5 JRU のIL-2を8時間毎に3回投与した。腫瘍の進行度はUICCによる病期分類³⁾を、肝予備能の指標としては日本肝癌研究会の臨床病期 (Clinical stage)⁴⁾を用い、治療効果は日本癌治療学会の固形がん化学療法直接効果判定基準⁵⁾により評価した (Table 1)。LAK細胞およびIL-2投与の選択に関しては患者ならびに家族により informed consent を得た。

[結 果]

症例1は肝右葉後区域に直径10cm、前区および外側区に最大2cmの肝細胞癌を認めた症例である。術前TAEを行い、肝右葉切除術および左葉の残存腫瘍に対し ethanol の注入をおこなった。術後36日目に肝動脈内注入 catheter より、 3.5×10^8 個のLAK細胞を投与した。投与57日目に死亡したが、その間肝腫瘍も増大した。剖検では、原発性肺癌が認められ、死因はこれによる呼吸不全であった。

症例2は肝右葉の直径12cmの単発の肝細胞癌で、右肺に転移を認めた症例である。肝右葉切除術後、AFP値は2,500 ng/mlであったが、

Table 1 Clinical review of HCC patients received LAK therapy

Patient	Age	Sex	UICC stage	Clinical stage	Liver resection	No. of LAK cells ($\times 10^8$)	Direct effect	Out come (days after LAK therapy) [cause for death]
1	66	Male	IV-A	I	Lt. lobectomy	3.5	PD*	57 [primary lung carcinoma]
2	54	Male	IV-B (Lung)	II	Rt. lobectomy	2.8	PD	25 [respiratory failure]
3	59	Male	IV-A	I	lateral and posterior inferior segment ectomy	1.0	PD	205 [cerebral bleeding]

*Progressive Disease (PD); increase of more than 25 % in one or more measurable lesions or the appearance of new ones.

All of the patients who received LAK therapy showed more than 25 % increase of lesions.

10 か月後には 11,000 ng/ml となり、 2.8×10^8 個の LAK 細胞を肝動脈内注入 catheter より投与した。投与後 25 日目に肺転移巣の急激な増大による呼吸不全で死亡した。

症例 3 は肝右葉後下区域に直径 4 cm、外側区域に直径 5 cm、他の区域にも直径 1 cm 程度の肝細胞癌を多数認めた症例である。肝外側区域切除および後下区域切除術を施行し、その後 TAE を行っていたが、腫瘍の増大を認めたため、術後 2 年 4 か月後に 1.0×10^8 個の LAK 細胞を肝動脈内注入 catheter より投与した。投与 205 日目に脳出血にて死亡したが、この間残肝の腫瘍は増大した。

3 症例とも発熱と軽い嘔気を認めた以外に重篤な副作用はなく、治療を完遂できた。しかし、3 例ともに LAK 細胞投与後も腫瘍の増大を認め抗腫瘍効果 (direct effect) は PD (progressive disease) であった (Table 1)。

II. Adriamycin-Lipiodol emulsion 間歇投与を併用した rIL-2 持続肝動脈内注入療法の検討 [対象と方法]

1988 年 8 月から 1991 年 2 月までの間に治癒切除不能のため肝切除術・TAE・EI などによる mass reduction 療法を施行した進行肝細胞癌

患者 24 例に、教室の山元ら⁶⁾の報告に基づいて adriamycin (ADR) と腫瘍への塞栓効果を持つ Lipiodol を混合 (Adriamycin-Lipiodol emulsion, ADR-Lip) し、間歇投与した。これらの患者を informed consent に基づき、患者本人ならびに家族により治療法を選択してもらい、次の 2 群に分けた。IL-2 の持続投与を併用した群 (A 群) は 17 例、ADR-Lip の間歇投与のみの群 (B 群) は 7 例であった。これらの 2 群間の臨床所見を χ^2 test で比較したが、UICC Stage, Clinical Stage および切除した肝区域数に差はなかった (Table 2)。ADR-Lip および IL-2 の投与方法は肝動脈内注入投与 (肝動注) とした。IL-2 は全身投与による副作用を少なくし、半減期の短い IL-2 の局所での濃度維持のため、持続的な肝動脈内注入投与 (持続肝動注) とした。すなわち A 群は肝動注 catheter を皮下埋め込み型 INFUSAID PUMP[®] に接続し、これを用いて持続的な IL-2 投与と週 1 回 ADR-Lip の間歇的投与を施行し、B 群は肝動注 catheter を INFUSE-A-PORT[®] に接続し、ADR-Lip のみを週 1 回間歇投与した。IL-2 の投与量は、cannulation 後 2 週目より初期量 0.05×10^6 JRU/day から開始し、4 週目までに 0.35×10^6 JRU/day とした。ADR-Lip は ADR 10 mg を 2 ml の蒸留

Table 2 Clinical review of HCC patients immunochemotherapy or chemotherapy following tumor mass reduction therapy

Group	No. of case	Male / Female	UICC stage III : IV-A : IV-B	Clinical stage I : II : III	No. of resected liver segments $\geq 2 : 2-1 < 1 : (-)$	Direct effects CR : PR : NC : PD
A (IL-2 + ADR-Lip)	17	16/1	1 : 13 : 3	12 : 4 : 1	3 : 3 : 4 : 7	4 : 2 : 3 : 8
B (ADR-Lip)	7	6/1	0 : 5 : 2	6 : 0 : 1	1 : 1 : 2 : 3	0 : 2 : 2 : 3

Complete Response (CR); no evidence of disease, with complete absence of all detectable lesions lasting more than 4 weeks.

Partial Response (PR); more than 50 % decrease in the total diameter of all measurable lesions, with no evidence of new ones.

No Change (NC); an objective response of less than 25 % in one or more existing lesions.

- 1) There was no significant difference between these two groups in UICC stage, clinical stage and no. of resected liver segments.
- 2) CR was observed in 4 patients in A(IL-2 + ADR-Lip) group.

水と0.5mlのLipodolに溶解してから emulsion とした。これら2群の治療効果を腹部 computed tomography (CT) および腹部超音波検査により評価した。評価基準は日本癌治療学会の固形がん化学療法直接効果判定基準⁵⁾によった。IL-2注入のimmunomodulator効果およびmass reduction療法による侵襲の指標として末梢血natural killer細胞(NK)活性の変動を測定した。測定はcannulation前(前2週以内), cannulation後1-2週目, 1-2か月目, 4-5か月目, 8-9か月目および11-12か月目に行った。NK活性の測定はtargetをK562とした⁵¹Cr-release assayにて行い, effector target比(E/T比)は20/1とした。また, A群では末梢血単核球の表面マーカー(CD3, CD4, CD8, CD16, CD57, CD25, HLA-DR)をLeu4, Leu3a, Leu2a, Leu11, Leu7, IL-2 receptor, HLA-DRを用いてfluorescence activated cell sortor (FACS)で測定した。また, 末梢血LAK活性をtargetをDaudi細胞とした⁵¹Cr-release assayにて行い, effector target比(E/T比)は10/1とし測定した。これらの各群の累積生存率はKaplan-Meier法で, 有意差検定は一般化Wilcoxon法で行った。NKおよびLAK活性の有意差検定はStudent's T-testまたはpaired T-testで行った。いずれも危険率5%以下を有意差ありとした。

[結 果]

A) 治療の継続可能期間・副作用

A群において, IL-2注入ポンプ(INFUSAID PUMPTM)は有効に作動し, 最長32か月間注入可能であった。患者体内に留置したりザーバー内に残るIL-2の1週間後の力価は, 溶解直後の力価の94.9±6.1%であった。また, IL-2の血中濃度は測定限界以下であった。IL-2とADR-Lip療法における副作用としては発熱と胸腹水貯溜および黄疸がみられたが, 一時的なIL-2投与量の減量および利尿剤の投与で治療は継続可能であった。

B) 免疫化学療法の腫瘍に対する直接効果

A群では4週間以上にわたる画像上の腫瘍の

消失が認められたCR症例は4例, 4週間以上にわたり腫瘍の50%以上の縮小が得られたPR症例は2例で, 奏功率は35.3%であった。NCは3例であった。また, 1例に遠隔転移巣の消失が認められた。B群ではPR2例, NCは3例で奏功率は28.6%であった(Table 2)。しかし, 両群間にはCR率, 奏功率ともに有意差はなかった。

C) 累積生存率

A群の1年生存率(1生率)は41.2%, 2年生存率(2生率)23.5%, 3年生存率(3生率)5.9%であった。B群では1生率28.6%で2年生存例は認めなかった。しかし, 両群間の累積生存率に差を認めなかった。また, 50%生存期間は, A群322日, B群328日であった(Fig. 1)。

D) 末梢血NK活性

mass reduction前の末梢血NK活性はA群(17例)ならびにB群(7例)では, それぞれ39.2±13.0%, 44.1±16.4%で有意差なく, mass reduction後は両群とも低下し, 23.4±10.5%, 21.5±9.9%であった。しかし, 1-2か月後にはそれぞれ52.1±18.0%, 37.1±21.9%と再上昇し, A群では術前より有意に高値(p<0.05)を示し, B群に対しても有意に高値(p<0.05)となった。さらに, 4-5か月後には, 53.1±13.8%および31.4±17.5%と高値が持続し, この時期に一致して抗腫瘍効果が得られた。しかし, 8-9か月目にはそれぞれ34.5±19.1%および37.0±15.0%とA群において低下を示し, 両群間には差が認められなくなった(Fig. 2)。

E) A群の末梢血単核球表面マーカーおよび末梢血LAK活性の変動

A群では活性化リンパ球の指標となるIL-2receptor(CD25)陽性細胞の割合はIL-2投与開始後上昇し, 2-8か月の間高値を示し, その後低下した。また, 末梢血LAK活性はIL-2receptorと同様に2-8か月の間高値を示し, その後低下した(Fig. 3)。この変動は末梢血NK活性(Fig. 2)の変動と類似しており, CR

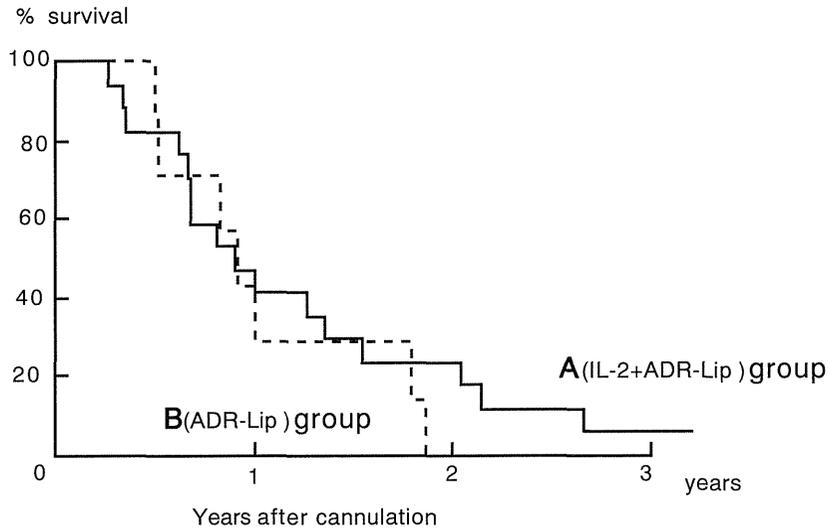


Fig.1. The cumulative survival rates after cannulation in the A(IL-2+ADR-Lip) group and the B(ADR-Lip)group. There was no significant difference between these two groups in survival rate.

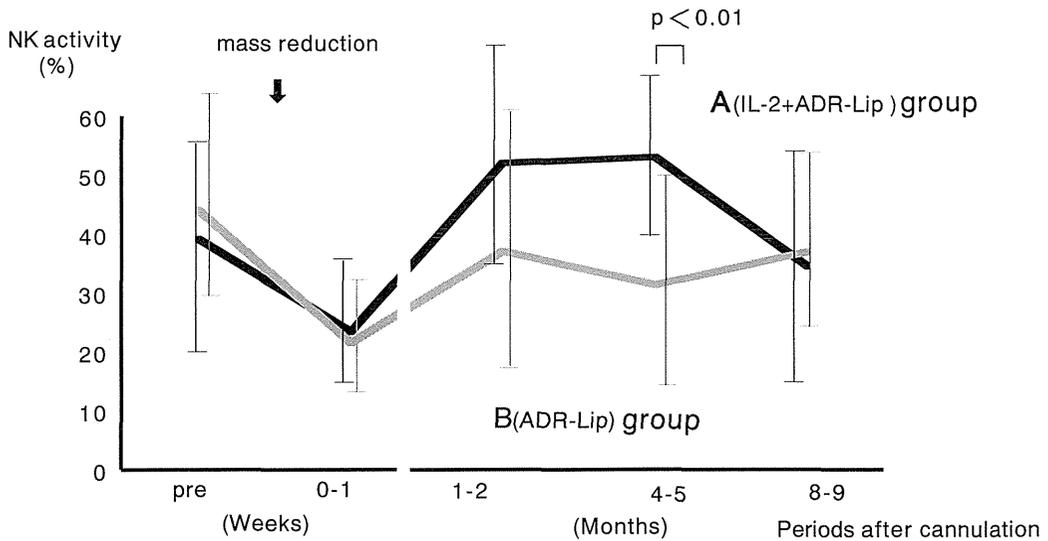


Fig.2. Changes in peripheral NK activity before and after cannulation in the A(IL-2 + ADR-Lip) group and the B(ADR-Lip)group. There was no significant differences between these two groups in the NK activity before cannulation. In the A group was the NK activity after cannulation higher than that before cannulation.

症例では血清AFP値の変動および腫瘍に対する直接効果の変動とも一致していた。しかし、T細胞のマーカーであるCD3、CD4、CD8陽性細胞、NK細胞のマーカーであるCD16、CD57、ならびに活性化リンパ球のマーカーで

あるHLA-DRはIL-2投与開始前後で有意な変動を認めなかった。

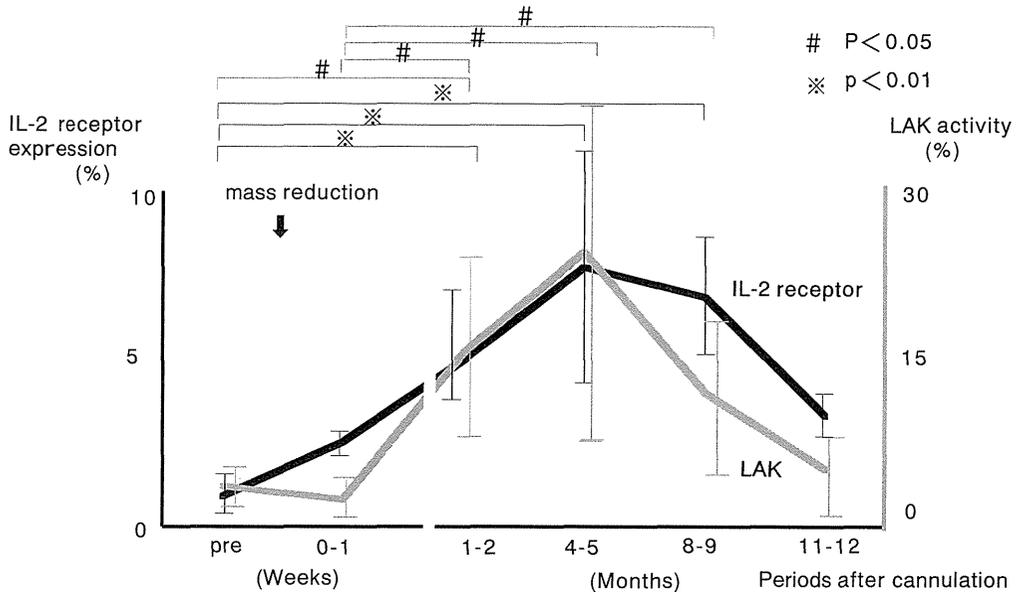


Fig.3. Changes in the IL-2 receptor positive lymphocyte subpopulation and peripheral LAK activity in A(IL-2 + ADR-Lip)group. The IL-2 receptor positive lymphocyte subpopulation and peripheral LAK activity increased significantly after cannulation and then decreased.

考 察

腫瘍に対する宿主の免疫反応は細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T Lymphocyte, CTL) や NK 細胞が大きな役割を担っているとされている。一方、肝炎ウイルス感染後の慢性肝疾患を伴う本邦の肝臓治療においては、免疫学的に他臓器癌とは異なった観点からの取り組みが要求される。著者らは進行肝細胞癌の有効な治療法を開発する目的で、その活性低下が癌の発生・進展に大きく関わっていると報告⁷⁾されている NK 細胞に着目し、末梢血 NK 活性と慢性肝障害の程度を表す臨床病期⁴⁾および腫瘍の進行度を表す UICC stage³⁾とを比較検討した¹⁾。その結果では、比較的強い肝機能の低下を示す臨床病期 II では、有意に末梢血 NK 活性も低下していた。しかし、癌の進行度と NK 活性の関係では遠隔転移陽性の Stage IV-B 患者において、NK 活性が他の Stage に比べ低下している傾向が認められたものの有意差はなく、末梢血 NK 活性は、主として併存する肝障害の程度と関連して

低下すると考えられた。しかしながら、今回の IL-2 の肝動注療法においては、末梢血 NK 活性の低下とともに肺などへの遠隔転移が認められたことから、末梢血 NK 活性は癌の転移防止機構とも密接に関連し、その指標となることを示唆すると考えられた。

著者らは、腫瘍性免疫能の低下した進行肝細胞癌の免疫学的治療法としては、最初に target となる腫瘍細胞自体を減少させ、同時に腫瘍から産生される免疫抑制物質を減量し、その後に effector を増量・増強させることが理想的であると考えている¹⁾。そこで、肝切除術・TAE・EI などにより、mass reduction 療法を行った後に、LAK 細胞の移入による養子免疫療法と IL-2 の持続投与によって、低下した IL-2 産生能を補い NK・LAK 活性および局所における CTL の抗腫瘍活性の増強をはかった。

LAK 療法については、肝細胞癌患者は併存する肝硬変症などによる汎血球減少症を合併しているために、末梢血から頻回に大量の細胞を採取し培養する必要がある LAK 療法を行うた

めの有効なリンパ球数を得ることは困難である。そこでより効率的に活性の高いLAK細胞を誘導することが重要となり、Muulら⁸⁾が行なっているIL-2 1000Cetus Unit (\equiv 1000JRU) /ml, 2%同種AB血清,末梢血リンパ球濃度 1.5×10^6 /mlで回転培養するという方法に基づいて効率的な培養条件を見いだすための検討²⁾を行い、『末梢血リンパ球濃度 2×10^6 /ml, IL-2 3420JRU/ml, 2%自己血漿または同種AB血清で3日間静置培養するのが最も効率よく高い細胞障害活性を得られる』という結果を得た。また現在ではTGF- β , IL-6, IL-10などを主体とする担癌患者の自己血漿に含まれる免疫抑制物質が報告⁹⁾されていることから、担癌患者の自己血漿の代用として、ABO適合同種血漿と同種AB血清を含む培地を検討し、ABO適合同種血漿を使うのが効率的であるとの結論も得た²⁾。

これらの基礎的研究を基に、Stage IV-A 2例, IV-B 1例にLAK療法を行なったが有効症例は得られなかった。その理由としては、a) 肝動脈内に投与したLAK細胞数が十分ではなかったこと、b) 進行肝細胞癌では前述したように、腫瘍による免疫抑制が生ずる以前に、肝障害による免疫能の低下が存在すること、c) 肝硬変症などにより、容易に胸腹水が貯溜する状態に加えて、LAK療法の際投与されるIL-2により胸腹水を来しやすく、IL-2を十分に投与できないことなどがあげられる。以上より、肝硬変を合併した進行肝細胞癌患者に対するLAK療法には限界があると考えられる。

一方、担癌患者ではNK活性¹⁰⁾、LAK活性¹¹⁾のみならず、腫瘍局所に浸潤した腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の抗腫瘍活性も抑制されていることが報告¹²⁾されている。これらの細胞性免疫能の低下、すなわち、癌の局所免疫ならびに全身の細胞性免疫の低下は、腫瘍の増大・進展を招き、遠隔転移を許容することとなると考えられる。この免疫能の低下はT cell機能の低下、特にIL-2産生能の低下¹³⁾に起因するといわれていた。これらは、最近の報告では、腫瘍由来

のtransforming growth factor (TGF- β)^{14,15)}によるhelper T細胞からのIL-2, IFN- γ , TNFの産生抑制や、腫瘍および担癌宿主のmacrophage由来のIL-6^{15,16)}によるIFN- γ , TNFの産生抑制などであるとされている。一方、これらの抗腫瘍活性の低下は、IL-2投与により改善が可能であるとも報告¹⁷⁾されている。そこで、IL-2の患者への大量投与が考えられるが、Rosenbergら¹⁸⁾はIL-2を経静脈的に8時間毎に大量投与し、49人の進行癌患者中、腎癌の1例にCRを悪性黒色腫の5例にPRを得たが、心筋梗塞や呼吸不全などの重篤な副作用により3例が死亡していると報告している。

これらの報告から著者らは、低下したIL-2産生能を補い、NK活性を増強させ、さらに肝細胞癌が存在する肝臓における局所免疫能を改善することを意図して、IL-2の肝動注療法を行った。その際、全身投与による副作用を少なくし、半減期の短いIL-2の局所での濃度維持のためIL-2の持続肝動注を選択した。一方、教室の山元ら⁶⁾は、肝細胞癌患者においてはsuppressor/helper比が健常人より大きいものの、IL-2の存在下での少量のADRの投与は進行肝細胞癌患者のsuppressor T cell分画を減少させ、同時にhelper T cell分画を増加させ、suppressor/helper比を改善するという結果を明らかにしている。そこで、ADRをimmunomodulatorとして併用することとした。

この治療を受けたIL-2 + ADR-Lip群では、CRが4例、PRが2例みられ、奏効率は35.3%であった。この抗腫瘍効果は末梢血NK活性が高値をとるときに得られ、肺などへの遠隔転移は抑制され、転移巣の消失症例も得られた。逆に、NK活性の低下あるいはIL-2投与中断症例では急速な肺転移巣の増大が認められた。

この優れた抗腫瘍効果にもかかわらず、A (IL-2 + ADR-Lip)群はB (ADR-Lip)群より、50%生存期間は良好であったものの、累積生存率には有意差は認められなかった。これは、腫瘍の増大を抑制する末梢血NK活性の高値が

持続せず、その低下とともに急速に腫瘍が増大したためと考えられる。

以上より本研究では、末梢血 NK 活性が IL-2 投与による免疫化学療法の効果ならびに宿主の免疫能の指標となり、これを長期にわたり高値に保つ治療法が重要であることが明らかとなった。

ところで、この治療における NK 活性および LAK 活性の低下と腫瘍の増大は IL-2 receptor 発現細胞の割合の低下と関連している。これは、文献的には長期化した大量の IL-2 の投与は可溶性 IL-2 receptor による競合的阻害や抗 IL-2 抗体, suppressor T-cell の誘導¹⁹⁾ など IL-2 活性を制限する negative feed-back 効果を引き起こすためと報告されている。また、NK, LAK 抵抗性腫瘍細胞の増加も考えられるとの報告²⁰⁾もある。

これらのことより、免疫系の著しい異常を引き起こすことなく、また NK 活性を低下させずに、長期間高値を維持できるような IL-2 の投与方法の開発、すなわち、副作用の発現と末梢血 NK 活性値の変動に基づき、末梢血 NK 活性を常に高値に維持するような、最小の IL-2 の投与方法を開発することが、この治療法による有効性を高めると考えられる。これらの経験をふまえ、A 群の最後の 2 例の患者では NK 活性が 40% 以上増強され、CR が得られたあと徐々に減量した。このうち 1 例が、7 年 3 か月生存中である。

ところで NK 細胞は major histocompatibility complex (MHC) class I により活性が抑制される²¹⁾とされ、また肝細胞癌では MHC class I の発現率が高いと報告²²⁾されており、この治療法による直接の抗腫瘍効果は NK 細胞より、MHC 拘束性の CTL の関与が大きいと考えられる。

最近、IL-12 の担癌宿主への投与による腫瘍の著明な退縮例が報告²³⁾されている。IL-2 ならびに IL-12 投与などを含めた、末梢血 NK 活性を含めた抗腫瘍細胞活性の長期間にわたる増強効果を得る方法が、進行肝細胞癌患者の生存

率を向上させると考えられる。

結 語

- 1) 末梢血 NK 活性は肝細胞癌患者に対する免疫療法の治療効果の指標となる。
- 2) IL-2 + ADR-Lip 療法では CR を 4 例に得られたが、奏効率・累積生存率では ADR-Lip 療法と差がなかった。
- 3) 長期的な生存率の向上には、長期にわたり NK 活性を高値に維持できる免疫化学療法の開発が必要である。

文 献

- 1) Yamamoto M, Iizuka H, Matsuda M, Nagahori K, Miura K et al.: The Indications for Tumor Mass Reduction Surgery and Subsequent Multidisciplinary Treatments in Stage IV Hepatocellular Carcinoma. *Jpn J Surg*, **23**: 675-681, 1993.
- 2) Iizuka H, Naganuma H, Yabusaki N, Komatsu H, Sakihama T et al.: Study on Lymphokine Activated Killer (LAK) Cells. I. Improved LAK cell induction in vitro. *Yamanashi Med J*, **97**-103, 1988.
- 3) Hermanek P, Sobin LH, eds: UICC, TNM Classification of Malignant Tumors. 4th ed. Springer-Verlag Berlin: 53-55, 1987.
- 4) 日本肝癌研究会編：原発性肝癌取扱い規約 第 3 版。金原出版，東京，1992。
- 5) 日本癌治療学会編：固形がん化学療法直接効果判定基準。日本癌治療学会誌，**21**: 931-942, 1986.
- 6) Yamamoto Y, Iizuka H, Yamamoto M, Tasaka K, Sugahara K: A proposal of effective immunochemotherapy using recombinant interleukin 2 and Adriamycin, and its theoretical background. *Yamanashi Med J*, **5**: 25-34, 1990.
- 7) Chuang W-L, Liu H-W, Chang W-Y: Natural killer cell activity in patients with hepatocellular carcinoma relative to early development and tumor invasion. *Cancer*, **65**: 926-930, 1990.
- 8) Muul LM, Director EP, Hyatt CL, Rosenberg SA: Large scale Production of human lymphokine activated killer cells for use in adoptive immunotherapy. *J Immunol Methods*, **88**: 265-275, 1986.
- 9) 栄枝弘司, 西原利治, 大西三朗: 肝細胞癌における natural killer 細胞活性及び lymphokine-

- activated killer 細胞活性の検討と血清中の両活性阻害因子の検索. 肝臓, **28**: 727-734, 1986.
- 10) Son K, Kew M, Rabson AR: Depressed natural killer activity in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **50**: 2820-2825, 1982.
 - 11) 藤川正直, 西原利治, 大西三朗: Lymphokine activated killer (LAK) 細胞を用いた養子免疫療法 of 肝細胞癌患者に及ぼす免疫学的変動とその臨床効果. 肝臓, **28**: 1202-1210, 1987.
 - 12) Holmes EC: Immunology of tumor infiltrating lymphocyte. *Ann Surg*, **201**: 158-163, 1985.
 - 13) 佃 守, 御手洗佳代子, 矢野間俊介, 岡三智子, 澤木修二: リンパ球幼若化率と interleukin-2 産生能の検討. 医学のあゆみ, **134**: 349-350, 1985.
 - 14) Li X-F, Takiuchi H, Zou J-P, Katagiri T, Yamamoto N, Nagata T, Ono S, Fujiwara H, Hamaoka T: Transforming growth factor- β (TGF- β)-mediated immunosuppression in the tumor-bearing state. *Jpn J Cancer Res*, **84**: 315-325, 1993.
 - 15) Yamamoto N, Zou J-P, Li X-F, Takenaka H, Noda S, Fujii T, Ono S, Kobayashi Y, Mukaida N, Matsushima K, Fujiwara H, Hamaoka T: Regulatory mechanisms for production of INF- γ and TNF by antitumor T cells or macrophages in the tumor-bearing state. *J Immunol*, **154**: 2281-2290, 1995.
 - 16) Utsumi K, Takai Y, Tada T, Ohzeki S, Fujiwara H: Enhanced production of IL-6 in tumor-bearing mice and determination of cells responsible for its augmented production. *J Immunol*, **145**: 397-403, 1990.
 - 17) Anderson TM, Ibayashi Y, Tokuda Y, Colquhoun SD, Holmwees EC, Golub SH: Effects of systemic recombinant interleukin-2 on natural killer and lymphokine activated killer activity of human tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer Res*, **48**: 1180-1183, 1988.
 - 18) Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP 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.
 - 19) Ting C-C, Yang SS, Hargrove ME: Induction of Suppressor T cells by interleukin 2. *J Immunol*, **133**: 261-266, 1983.
 - 20) 小松達司, 山内克己, 長谷川潔, 古川隆二, 中西敏巳, 次田 正, 武藤晴臣, 磯部義憲, 田中茂治, 長田広司, 清水 勝, 小幡 裕: 2例の肝細胞癌患者に対して経肝動脈的に投与された Lymphokine activated killer (LAK) 細胞と Interleukin-2 (IL-2) の臨床効果. 肝臓, **28**: 477-482, 1987.
 - 21) Colona M, Samaridis J: Cloning of immunoglobulin -superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science*, **268**(5209): 367-8, 1995.
 - 22) Paterson AC, Sciort R, Kew MC, Callea F, Dusheiko GM, Desmet VJ: HLA expression in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, **57**: 369, 1988.
 - 23) Zou JP, Yamamoto N, Fujii T, Takenaka H, Kobayashi M, Herrmann SH, Wolf SF, Fujiwara H, Hamaoka T: Systemic administration of rIL-12 induces complete tumor regression and protective immunity: response is correlated with a striking reversal of suppressed INF-gamma production by anti-tumor T cells. *Int Immunol*, **7**: 1135-1145, 1995.