

腎細胞癌患者の術後補助療法における ヒト γ 型インターフェロン投与の免疫学的検討

—Three color flowcytometry による末梢血リンパ球の変動の解析—

大阪警察病院泌尿器科 (部長: 藤岡秀樹)

安永 豊, 西村 健作, 三浦 秀信, 高寺 博史

黒田 秀也*, 岸本 知己**, 藤岡 秀樹

IMMUNOLOGICAL STUDY OF THE POSTOPERATIVE ADJUVANT TREATMENT WITH INTERFERON GAMMA IN PATIENTS WITH RENAL CELL CANCER —MEASUREMENT OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE SUBSETS WITH THREE COLOR FLOWCYTOMETRY—

Yutaka Yasunaga, Kensaku Nishimura, Hidenobu Miura,

Hiroshi Takatera, Hideya Kuroda,

Tomomi Kishimoto and Hideki Fujioka

From the Department of Urology, Osaka Police Hospital

The antitumoral effects of interferon (IFN) against renal cell carcinomas (RCC) are considered to consist of a direct tumoricidal activity and an indirect action related to the host immune system. Monitoring to T lymphocytes is an immunological parameter to evaluate the antitumoral effects of IFN. To examine in detail the change of CD8 positive cells reported previously, we analyzed the change of the peripheral blood T lymphocyte subsets using three color flowcytometry during the period of IFN- γ administration.

We administered recombinant interferon gamma (rIFN- γ) to the patients with renal cell cancer. Eighteen patients received a prophylactic injection of rIFN- γ (300×10^4 units per week) after nephrectomy. Among them three patients developed distant metastases and one had local recurrence after the start of rIF- γ therapy. We evaluated the immunological change by measurement of the peripheral blood lymphocyte subsets consisting of activated cytotoxic T lymphocytes (ACTL), activated suppressor T lymphocytes (ASTL), activated suppressor-inducer T lymphocytes (AITL), cytotoxic T lymphocytes (CTL), helper T lymphocytes (HTL), and suppressor-inducer T lymphocytes (SITL), from the start of rIFN- γ injection. We also estimated the natural killer (NK) activity by a cytolytic test at the same points.

NK activity consecutively increased throughout the period of administration of rIFN- γ . We found significant enhancement of ACTL at the sixth month ($P < 0.05$), ASTL at the third month ($P < 0.01$) and NK activity at the second week, the first month, the third month and the sixth month ($P < 0.01$) after the start of rIFN- γ injection. We also found a significant decrease of CTL at 48 hours ($P < 0.01$) and SITL at the second week, and the first month ($P < 0.05$) after the start of rIFN- γ injection. The ratio of ACTL/ASTL significantly increased six months later. Our findings suggest a partial relationship between the cytotoxic T lymphocytes and IFN- γ tumoricidal activity.

(Acta Urol. Jpn. 41: 85-92, 1995)

Key words: Renal cell carcinoma, Adjuvant therapy, Interferon- γ , Immunological study

* 現: 小松病院泌尿器科

**現: 市立堺病院泌尿器科

緒 言

インターフェロン（以下 IFN と略す）の抗腫瘍効果を評価する免疫学的方法のひとつとして、リンパ球表面抗原を認識する各種のモノクローナル抗体を使って、細胞性免疫の主体をなすTリンパ球サブセットを測定し、その変動を解析する手法が用いられている。従来は2つの異なるモノクローナル抗体でリンパ表面抗原を評価する two color flowcytometry までが限界であったが、最近開発された three color flowcytometry^{1,2)} を用いることにより、Tリンパ球のより詳細な解析が可能になった。今回われわれはこの方法を用いて IFN- γ 投与前後における腎細胞癌患者の末梢血中のTリンパ球サブセットの変動を調べ、腎細胞癌における IFN- γ 投与の意義について検討したので報告する。

対象と方法

症例は1991年4月から1993年10月までのあいだに当科において腎摘出術を施行した、遠隔転移を有さない腎細胞癌症例18例を対象とした (Table 1)。いずれの症例も原発巣摘除ののち、手術後の再発・転移の予防目的に IFN- γ の投与をおこなった。年齢は37歳から79歳、平均年齢60歳、男性12名、女性6名、左側発生が6例、右側は12例であった。

術後2週間を経過し、全身状態の回復を確認したのち、組み換え型ヒト γ 型 IFN (イムノマックス[®]) の投与を開始した。原則として300万単位を週1回筋肉内に投与、3カ月以上継続し、最高で術後2年弱の補助療法を行い、投与開始後6カ月間を今回の観察期間とした。IFN- γ 投与前と、投与48時間後、2週間後、1カ月後、3カ月後、6カ月後に患者末梢血を採

Table 1. Characteristics of patients treated with IFN- γ

No.	Pt.	Side	Grade	Stage	Ope.	Duration*	Prognosis
1	54 M	L	G2	pT2	Nephrectomy	2 W	3 M Dead of other cause
2	79 M	R	G2	pT3a	Nephrectomy	24 M	35 M NED**
3	61 M	L	G1	pT2	Nephrectomy	24 M	33 M NED
4	59 F	R	G1	pT3a	Nephrectomy	23 M	33 M NED
5	44 M	R	G2	pT3a	Nephrectomy	27 M	10 M Liver meta. and Local rec.
6	60 M	L	G1	pT3a	Nephrectomy	28 M	28 M NED
7	71 M	L	G1	pT2	Nephrectomy	24 M	28 M NED
8	57 M	R	G1	pT1	Partial nephrectomy	24 M	27 M NED
9	44 M	R	G1	pT3a	Nephrectomy	14 M	17 M NED
10	69 F	R	G3	pT2	Nephrectomy	17 M	17 M NED
11	42 M	L	G1	pT3a	Nephrectomy	15 M	15 M NED
12	63 M	R	G2	pT3b	Nephrectomy	12 M	1 M Lung meta. (multiple)
13	75 F	R	G1	pT2	Nephrectomy	15 M	3 M Lung (multiple) and regional LN meta.
14	74 M	R	G2	pT2	Nephrectomy	13 M	13 M NED
15	37 F	R	G1	pT2	Partial nephrectomy	12 M	12 M NED
16	71 F	R	G1	pT2	Nephrectomy	8 M	8 M NED
17	52 F	L	G1	pT2	Nephrectomy	6 M	6 M NED
18	65 M	R	G2	pT2	Nephroureterectomy	6 M	6 M NED

* Duration : duration while IFN- γ administration
 ** NED : no evidence of disease

Table 2. Definition of T lymphocyte subsets determined by three color flowcytometry

	HLA-DR	CD 11b	CD 8		CD 45 R	HLA-DR	CD 4
ASTL	(+)	(+)	(+)	AITL	(+)	(+)	(+)
CTL	(-)	(-)	(+)	SITL	(+)	(-)	(+)
ACTL	(+)	(-)	(+)	HTL	(-)	(-)	(+)
ASTL	Activated Suppressor T lymphocytes			AITL	Activated Suppressor-inducer T lymphocytes		
CTL	Cytotoxic T lymphocytes			SITL	Suppressor-inducer T lymphocytes		
ACTL	Activated cytotoxic lymphocytes			HTL	Helper T lymphocytes		

取し, リンパ球分析を行った. 対象症例のうち1例は IFN- γ 投与開始3カ月後に他因死したため3カ月後までのデータしかえられなかったが, 残る17例については6カ月の観察を遂行した.

分析には Becton Dickinson 社の Leu シリーズモノクローナル抗体を用いた. 患者全血にそれぞれ3種類のモノクローナル抗体を加え, flowcytometry を用いて 9,000個まで細胞解析を行い, Tリンパ球の各サブセットに存在するリンパ球分画を FACScan にて測定し, 末梢血リンパ球数を乗じて絶対値を算出した. 検討したリンパ球サブセットは ACTL: 活性化細胞障害性 Tリンパ球, CTL: 細胞障害性 Tリンパ球, ASTL: 活性化サブプレッサー Tリンパ球, AITL: 活性化サブプレッサーインデューサー Tリンパ球, SITL: サブプレッサーインデューサー Tリンパ球, HTL: ヘルパー Tリンパ球の6項目である (Table 2). また別に target cell としてヒト白血病由来の K562 cell line を用いて ^{51}Cr 放出を測定した細胞傷害試験を行い, natural killer (NK) 活性値を求めた.

以上6つの Tリンパ球サブセットと NK 活性とについて, IFN- γ 投与前と投与後の各時点において比較検討を行った. 分析にはノンパラメトリック統計学的手法として Wilcoxon 検定を用いた.

結 果

1) Tリンパ球サブセットの変動

まず従来の single color 分析に準じて, CD4 陽性細胞, CD8 陽性細胞の変動を調べた (Fig. 1). CD4 $^{+}$ 細胞はおおむね低下を示し, 投与前 $866 \pm 274 / \text{mm}^3$ から投与2週間後には $748 \pm 236 / \text{mm}^3$ と有意な低下を認めた ($p < 0.05$). また CD8 $^{+}$ 細胞は投与前 $384 \pm 173 / \text{mm}^3$ から投与開始48時間後は $282 \pm 206 / \text{mm}^3$ と有意な低下を示したものの, その後は上昇に転じ, 投与6カ月後には $481 \pm 260 / \text{mm}^3$ と増加を示した.

次に three color 分析を用いて測定した各サブセットについて IFN- γ 投与前との比較を試みた (Fig. 2). CTL, ACTL はともに投与開始直後には若干低下し, そののちは上昇するといった共通の傾向を示した. 特に CTL は投与前 $203 \pm 118 / \text{mm}^3$ から投与48時間後は $127 \pm 86 / \text{mm}^3$ へと有意な低下 ($p < 0.01$) を, ACTL は投与前 $126 \pm 68 / \text{mm}^3$ から投与6カ月後は $171 \pm 103 / \text{mm}^3$ と有意な増加 ($p < 0.05$) を認めた. サブプレッサー系統については ASTL が投与前 $55 \pm 31 / \text{mm}^3$ から投与1カ月後は $89 \pm 52 / \text{mm}^3$ と有意

な増加 ($p < 0.01$) を示したが, SITL は投与前 $391 \pm 139 / \text{mm}^3$ から投与2週間後は $332 \pm 144 / \text{mm}^3$, 1カ月後は $307 \pm 137 / \text{mm}^3$ とむしろ有意な減少を認めた ($p < 0.05$). AITL, HTL については有意な変動はみられなかった. また ACTL/ASTL 比をとって変動をみみると, 投与前の 2.72 ± 1.55 に比べて, 投与6カ月目には 6.32 ± 8.55 と有意な増加を認めた (Fig. 3).

2) NK 活性の変動 (Fig. 4)

IFN 投与開始後一貫して NK 活性値は上昇傾向を示した. 投与前 (8.8 \pm 6.1%) に対し, 投与2週間後 (16.8 \pm 13.0%), 1カ月後 (19.8 \pm 11.5%), 3カ月 (23.2 \pm 12.4%), 6カ月後 (26.0 \pm 21.0%) と有意に上昇していた ($p < 0.01$).

3) 再発転移例について

今回対象とした18例中, 再発転移を認めたのは3例, うち観察期間内に転移を認めたのは症例12, 13の2例である. 観察期間内を過ぎて投与開始10カ月後に再発転移を認めた症例5も含めて, 3例についての Tリンパ球サブセットおよび NK 活性値を示す (Table 3). 症例5は転移発生直前まで NK 活性は上昇を続けていたが ASTL, AITL はともに低値を続けていた. 症例12においても転移発生後も NK 活性は上昇傾向を続けたが, 転移前には SITL, HTL および CTL が低下傾向を示していた. 症例13については ACTL, ASTL は若干上昇をみるものの, 転移発生後も NK 活性は漸減傾向を示し, また HTL, CTL は低値を保ったままであった. しかしながら3症例に共通した一定の傾向はみられなかった.

考 察

IFN のなかでも γ は *in vitro* においてはヒト癌細胞に対し細胞増殖抑制効果が α , β より優れているとされ^{3,4)}, *in vivo* においても NK 活性の増強⁵⁾, マクロファージの活性化⁶⁾, さらに HLA-DR 抗原の発現と合成を促進する作用⁷⁾ を有していると報告されている. 臨床的にも IFN- γ は α や β に比べて生体の免疫機構に最も強く影響を与えることから, より大きな抗腫瘍効果をもつものと期待されている.

IFN の抗腫瘍効果を判定する免疫学的手法として, リンパ球サブセットの測定が行われている. 従来はリンパ球の表面抗原を蛍光色素で標識した1種類のモノクローナル抗体で認識する single color flowcytometry 分析が用いられていた. その分析を用いた報告では, CD4 $^{+}$ 細胞の増加⁸⁾, CD16 $^{+}$ 細胞の増加^{9,10)} あるいは CD8 $^{+}$ 細胞の減少ならびに CD4/8 比の増

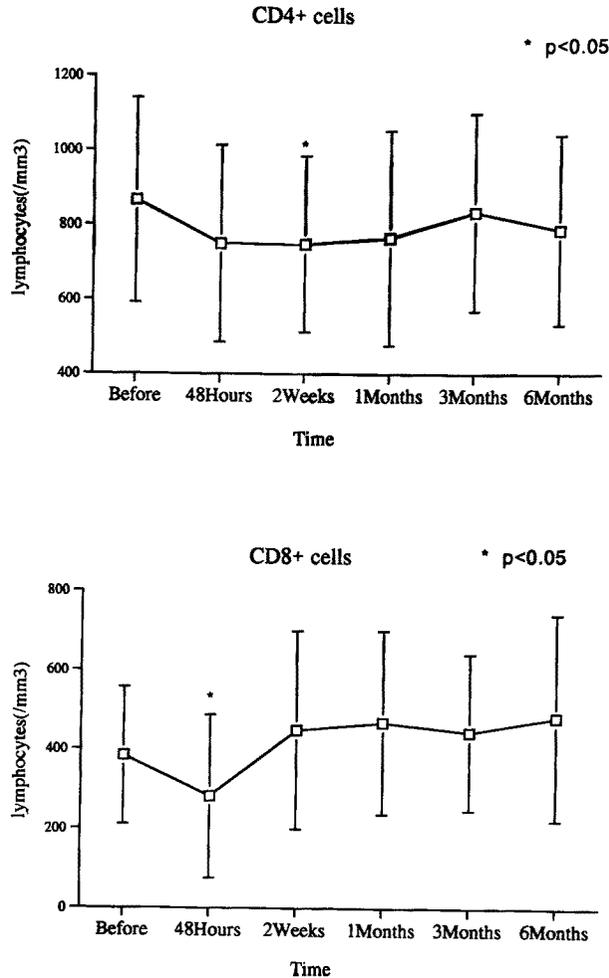


Fig. 1. Changes of CD4⁺ and CD8⁺ cells before and after the start of IFN- γ

加¹¹⁻¹³⁾といった報告がみられるが、今回のわれわれの検討では CD4⁺ 細胞はむしろ低下を示し、CD 8⁺ 細胞は投与開始初期には低下を、長期にわたっては増加を示していたことから、過去の報告とはやや異なる結果がえられた。

このように single color 分析ではまだ一定の見解がえられていないことは、リンパ球の各サブセットが複数の抗原性をもつこと、たとえば CD 4⁺ 細胞はヘルパー T 細胞とインデュースー T 細胞の両者を、CD 8⁺ 細胞は細胞障害性 T 細胞とサプレッサー T 細胞の両者を反映することから、single color 分析では T リンパ球の正確な動態の把握が困難であると考えられた。近年のモノクローナル抗体の開発にも助けられ、2 種類のモノクローナル抗体を組み合わせた two color flowcytometry 法を用いることで、従来の single

color 分析では分別できない抗原性の識別が可能になった。IFN- γ 投与後の末梢血リンパ球の two color 分析の検討は少ないが、腫瘍浸潤リンパ球についての検討¹³⁾では、術前投与された IFN- γ で CD8 陽性細胞が低下を示したことは、サプレッサー T 細胞の抑制によるものと考えられている。他方 IFN- α についての検討では、腎癌の増悪症例にサプレッサー T 細胞の上昇と細胞障害性 T 細胞の抑制がみられたとする報告¹⁴⁾がみられる。また宮本ら¹⁵⁾は CD8 陽性細胞が IFN 投与後有意に上昇していたことを示すとともに、two color 分析の結果サプレッサー T 細胞、細胞障害性 T 細胞の両者がともに上昇した結果であると報告している。

これらの事実をふまえて、われわれはより詳細な T リンパ球分析、すなわち CD4 陽性細胞、CD8 陽

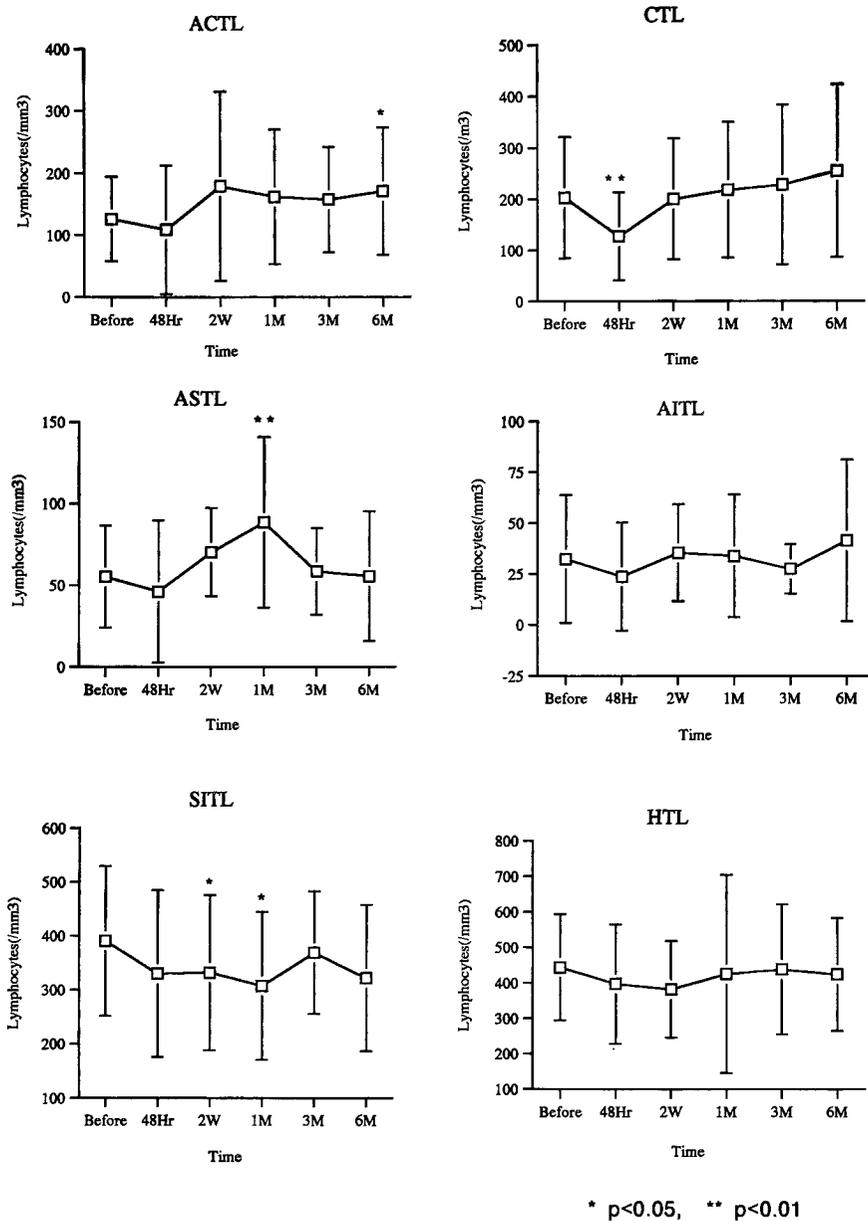


Fig. 2. Changes of several T lymphocyte subsets, before and after the start of IFN- γ

性細胞のなかでも現実に活性化状態で働いているサブセットの解析を目的とした。3種類目のモノクローナル抗体として HLA-DR を掛けあわせることでサブプレッサーT細胞, 細胞障害性T細胞の活性化ユニットの実数を測定することができるが, これは three color flowcytometry を用いることではじめて可能になった。

今回の結果からは, 細胞障害性T細胞は初期には低

下を示すものの, 長期には増加傾向をとることが示された。このことは IFN- γ のもつ細胞障害作用が比較的長期に影響をおよぼすことを意味しているとも考えられる。しかしながら活性化状態でサブプレッサーT細胞は IFN- γ 投与後有意な増加を示す一方, サブプレッサーインデューサーT細胞はむしろ低下を, またヘルパーT細胞は特に変動を示さなかったことなど一様には説明のつかない現象が示され, IFN- γ の免疫学的

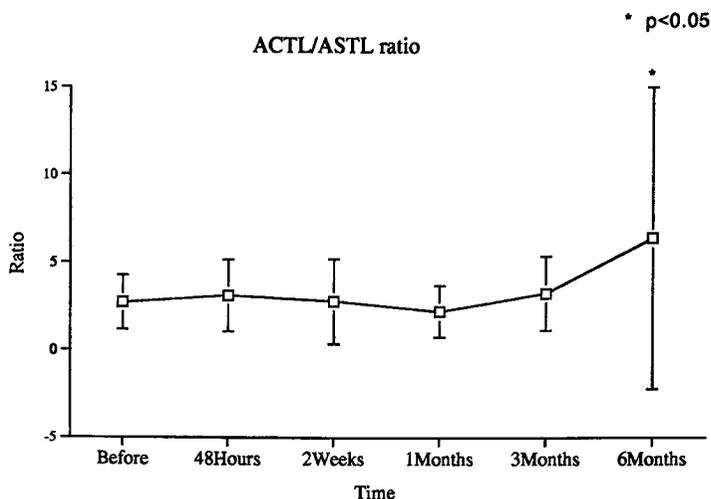


Fig. 3. Change of ACTL per ASTL ratio, before and after the start of IFN- γ

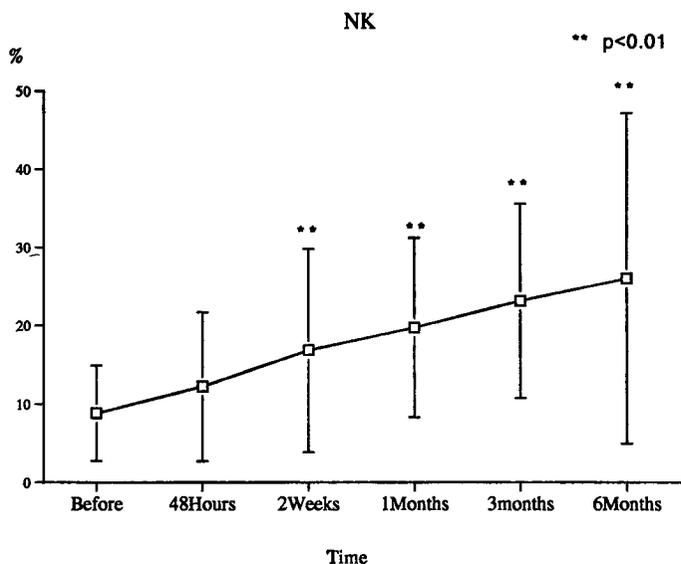


Fig. 4. Change of natural killer (NK) activity, before and after the start of IFN- γ

作用におもにどのサブセットが関与しているかについては一定の結論がえられなかった。ただ ACTL/ASTL 比をとってしてみると、IFN- γ 投与開始6カ月後には有意な増加を示した (Fig. 2)。このことは活性化細胞障害性 T 細胞と活性化サブレッサー T 細胞の両者の相対的な関係に IFN- γ が大きく関与していることを示唆するものと思われる。恐らく ACTL の増加が ASTL のそれを上回るものと思われるが、その検討については今後の課題である。

NK 活性の検討においては conventional な細胞

傷害性試験を今回用いた。われわれの検討では総じて NK 活性は一貫して有意な上昇を認めた。in vitro または in vivo において NK 活性値は上昇を示すという報告^{12,16)}と共通するものの、今回の対象症例のなかでは、NK 活性が高値を保ちながらも転移を起こすに至ったもの (case 5) や、転移発生後も上昇を示していたもの (case 12) など、抗腫瘍効果の指標としては疑わしい結果も示された。IFN- γ 投与によっても NK 活性は変動を示さなかったとする報告⁸⁾や、逆に IFN- α の投与量に平行する変動がみられた

Table 3. NK activities and each lymphocyte subset in recurrent and/or metastatic cases, before and after the start of IFN- γ .

Case No.	ACTL (/mm ³)						ASTL (/mm ³)						CTL (/mm ³)					
	Before	48 H	2 W	1 M	3 M	6 M	Before	48 H	2 W	1 M	3 M	6 M	Before	48 H	2 W	1 M	3 M	6 M
5	148	79	126	260	275	175	45	97	74	50	46	34	189	169	120	277	298	278
12	271	143	230	ND	285	338	69	25	82	ND	156	85	230	96	155	ND	156	272
13	54	37	69	67	ND	102	45	39	106	100	ND	105	41	28	23	67	ND	81

Case No.	AITL (/mm ³)						SITL (/mm ³)						HTL (/mm ³)					
	Before	48 H	2 W	1 M	3 M	6 M	Before	48 H	2 W	1 M	3 M	6 M	Before	48 H	2 W	1 M	3 M	6 M
5	13	6	29	12	32	21	315	235	171	337	393	213	581	726	298	614	725	535
12	66	46	73	ND	95	115	427	376	287	ND	383	492	578	558	367	ND	472	696
13	10	35	51	32	ND	60	91	144	76	98	ND	109	217	328	168	247	ND	238

Case No.	NK (%)					
	Before	48 H	2 W	1 M	3 M	6 M
5	21.7	12.2	50	35	45	60
12	6.6	1.2	11	ND	15	24
13	10.6	8.9	13	8.6	ND	6.5

ND indicates not determined

とする報告¹⁵⁾もあり, われわれの週1回投与は投与間隔・投与量の点で適切であったかどうか疑問が残る。IFNの至適投与条件についてはまだ確立したものはなく, われわれの検討においても今後の重要な課題のひとつであると考え。さらにNK活性の分析方法についても今回はプロトコールとして細胞傷害試験を用いたが, 今後はCD16陽性細胞を対象としたサブセットの測定を行うことにより, より正確なNK細胞の把握が望ましいものと考えている。

以上多くの課題を残すものの, NK活性測定およびリンパ球サブセット分析は, IFN- γ の抗腫瘍効果を免疫学的に検討する方法として欠かせないものであると思われる。今後はより症例数を増やすことはもちろん, three color分析などのより詳細な免疫学的手法を用いることで, 再発転移の際の免疫動態を明らかにすることが必要であり, そのことが治療指標の確立に結び付くものであると思われる。

結 語

腎摘除術を行った腎癌患者18例に対して予防的にIFN- γ を投与し, 投与前後の末梢血リンパ球サブセットの変動について調べた。その結果IFN- γ 投与前後のTリンパ球の各サブセットについては有意な変動はみられなかったものの, 活性化細胞障害性T細胞(ACTL)/活性化サブレッサーT細胞(ASTL)比は投与開始6カ月後に有意な増加を示した。

腎細胞癌患者に対するIFN投与のモニタリングとして, 現在NK活性値の測定が簡便で且つ有用であ

るが, 今後はthree color flowcytometryを用いたより詳細なリンパ球解析が必要になるものと思われる。

本論文の要旨は第80回・第81回日本泌尿器科学会総会において発表した。なお本稿を終えるにあたり, three color flowcytometry測定に関して御協力いただいた塩野義バイオメディカルラボの諸氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Parks DR, Hardy RR and Herzenberg LA: Three-color immunofluorescence analysis of mouse B-lymphocyte subpopulations. *Cytometry* 5: 159-168, 1984
- 2) 田辺 博, 今井直基, 渡辺 進, ほか: Three Color Flow Cytometryを用いた胃癌患者のリンパ球サブセットの検討. *外科* 53: 521-524, 1991
- 3) 佐藤孝三郎, 杉田憲治, 和田 透, ほか: ヒト組換え型インターフェロン-ガンマ(S-6810)のin vitroにおける抗ウイルス作用および細胞増殖抑制作用. *基礎と臨* 20: 4021-4027, 1986
- 4) Blalock JE, Georgiades JA, Langford MP, et al.: Purified human immune interferon has more potent anticellular activity than fibroblast or leukocyte interferon. *Cell Immunol* 49: 390-394, 1980
- 5) David W: Regulation of susceptibility to natural killer cell's cytotoxicity and regulation of HLA synthesis.: Differing efficacies of alpha, beta and gamma interferons. *J Interferon Res* 2: 329-338, 1982
- 6) Pace JL, Russel SW, Torres BA, et al.: Re-

- combinant mouse γ interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing. *J Immunol* **130**: 2011, 1983
- 7) Basham TY, Yip YK and Vilcek J: Specific binding of ^{125}I -human interferon- γ to high affinity receptors on human fibroblasts. *J Biol Chem* **257**: 11301-11304, 1982
 - 8) Marumo K, Murai M, Tazaki H, et al.: Immunologic effects of recombinant interferon-gamma in patients with renal cell carcinoma. *Keio J Med* **39**: 97-101, 1990
 - 9) Onishi T, Machida T, Masuda F, et al.: Assessment of tumor infiltrating lymphocytes, regional lymph node lymphocytes and peripheral blood lymphocytes and their reaction to interferon gamma in patients with renal carcinoma. *Br J Urol* **67**: 459-466, 1991
 - 10) 鈴木正泰, 町田豊平, 大西哲朗: インターフェロン投与による腎細胞癌患者の細胞性免疫能の変化. *Biotherapy* **2**: 200-203, 1988
 - 11) Aulitzky WE, Aulitzky W, Gastl G, et al.: Acute effects of single doses of recombinant interferon- γ on blood cell counts and lymphocytes subsets in patients with advanced renal cell cancer. *J Interferon Res* **9**: 425-433, 1989
 - 12) Grups JW and Frohmuller HGW: Influence of cyclic interferon gamma on lymphocytes and their subpopulations in patients with renal carcinoma. *Urology* **35**: 111-113, 1990
 - 13) 大西哲朗, 町田豊平, 増田富士男, ほか: インターフェロン- γ 術前投与の腎細胞癌根治術後免疫能への影響について. *泌尿紀要* **37**: 671-678, 1991
 - 14) Rinehart JJ, Young D, Laforge J, et al.: Phase I/II trial of recombinant gamma-interferon in patients with renal cell carcinoma: Immunologic and biologic effects. *J Biol Response Mod* **6**: 302-312, 1987
 - 15) 宮本忠幸, 高橋正幸, 湯浅 誠, ほか: 腎細胞癌に対する IFN- α 療法の免疫学的検討. *西日泌尿* **56**: 852-856, 1994
 - 16) Barna BP, Thomassen MJ, Sergi J, et al.: Immunologic changes in renal cell carcinoma patients receiving gamma interferon. *Oncology* **48**: 464-468, 1991
- (Received on May 23, 1994)
(Accepted on November 1, 1994)
(迅速掲載)