

腎摘除術あるいは Interferon- α 投与による 腎癌患者の末梢血リンパ球サブセットの変動

三重大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 川村寿一教授)

有馬 公伸, 柳川 眞, 杉村 芳樹

栃木 宏水, 川村 寿一

鈴鹿中央病院泌尿器科 (部長 : 斎藤 薫)

斎 藤 薫

山本総合病院泌尿器科 (部長 : 山崎義久)

山 崎 義 久

済生会松阪病院泌尿器科 (部長 : 森 脩)

森 脩

大塚細胞工学研究所 (所長 : 足立正一)

大 本 安 一

大塚製薬応用開発部 (部長 : 本間美之)

中 川 雅 照

EFFECTS OF NEPHRECTOMY AND INTERFERON ADMINISTRATION ON IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA

Kiminobu Arima, Makoto Yanagawa, Yoshiki Sugimura,

Hiromi Tochigi and Juichi Kawamura

From the Department of Urology, Mie University School of Medicine

Kaoru Saitoh

From the Department of Urology, Suzuka Chuou Hospital

Yoshihisa Yamazaki

From the Department of Urology, Yamamoto Sougou Hospital

Osamu Mori

From the Department of Urology, Saiseikai Matsuzaka Hospital

Yasuichi Oomoto

Otsuka Pharmaceutical Co., LTD Cellular Technology Institute

Masateru Nakagawa

Otsuka Pharmaceutical Co., LTD Product Application Development Dept.

To study the changes in the subsets of peripheral blood lymphocytes before and after nephrectomy and interferon (IFN) therapy, 57 patients with renal cell carcinoma were divided into three groups; one group consisted of 16 patients with metastasis who had been administered IFN- α , one group consisted of 16 patients without metastasis who had been administered IFN- α , and the other consisted of 25 patients without metastasis who had not been administered IFN- α .

Immunological parameters such as percentages of NK (Leu-11⁺ |Leu-7⁻) cells, percentages of

activated CD4 (Leu-3a⁺ HLA-DR⁺) positive cells and percentages of activated CD8 (Leu-2a⁺ HLA-DR⁺) positive cells were examined by two color flow cytometry and the percentages of CD4 (Leu-3a⁺) positive cells, percentages of CD8 (Leu-2a⁺) positive cells values and the ratio of percentages of CD4 positive cells/percentages of CD8 positive cells were evaluated.

The percentages of NK cells showed a tendency to decrease after nephrectomy and the administration of IFN- α . The percentage of CD4 positive cells showed a significant increase after the administration of IFN- α . The percentage of activated CD4 positive cells and the ratio of percentage of CD4 positive cells/percentage of CD8 positive cells showed a tendency to increase slightly. The percentage of CD8 positive cells and percentage of activated CD8 positive cells showed no particular changes. There was a specific correlation between the administration of IFN- α and the changes of percentage of CD4-positive cells and this suggests that the administration of IFN- α led to the increase of helper T cells.

(Acta Urol. Jpn. 40: 469-474, 1994)

Key words: Renal cell carcinoma, Interferon- α , PBL subset, Nephrectomy

緒 言

現在転移を有する腎癌に対して interferon (IFN)- α の投与が行われているが、有効率は15~20%に過ぎない。IFN- α の作用機序は、腫瘍直接作用、免疫担当細胞の賦活化、腫瘍細胞の修飾作用など種々の要素が関わっている。腎癌患者に IFN- α を投与した場合の生体内の免疫系の変化を知り、さらに IFN- α 投与が有効か否かを事前に予測できる指標がみつければ IFN 治療の経済効率が增加する。また、腎摘除術(腎摘)前後の免疫系の変化の違いにより、その治療後に再発しやすい症例か否かを事前に予測できる指標がみつければ、治療の一助ともなる。

今回われわれは、腎癌患者において腎摘除術あるいは IFN- α 投与によってみられる免疫能の変化を末梢血中のリンパ球サブセットの変動から検討した。

対象および方法

対象：三重大学付属病院およびその関連病院にて治療を受けた腎癌患者57名(男43名、女14名、平均年齢59.9歳)である。IFN- α 投与群32例、無投与群25例であり、Robson 分類の stage 別では、stage I が27例、stage II が6例、stage III が8例、stage IV が16例であった。

方法：遠隔転移を有し、IFN- α による治療を実施した症例(MI 群)、遠隔転移がなく根治的腎摘除術後 IFN- α を投与した症例(M0 群)および根治的腎摘除術のみの症例(IFN- α (-) 群)の3群に分け、腎摘除術前後あるいは IFN- α 投与前後の比較検討を行った。

1) IFN- α 投与方法

IFN- α は、原則として 5×10^6 I.U., i.m. を1日1回、MI 群では週5回以上、M0 群では週2~3回投

与した。

2) 免疫能の評価

M1 群は IFN- α 投与前と投与後(平均12.1週 $\pm$ 7.1週)に、M0 群は術前と IFN- α 投与中の安定期(平均13.0週 $\pm$ 5.7週)に、IFN- α (-) 群は術前と術後安定期(平均20.6週 $\pm$ 11.9週)において two color flow cytometry によるリンパ球サブセット検査を施行し、比較検討を行った。

染色法は、FITC および PE 標識抗体(Becton Dickinson, Leu シリーズ)を用い、直接法を利用した二重染色で、測定器は、FACSscan (Becton Dickinson 社製)を使用し、測定細胞数は10,000個とした。

NK 細胞と考えられる細胞集団として CD16 と CD57 (Leu-11⁺ Leu-7⁻) 陽性細胞比率(以下 NK 細胞比率とする)、活性化 CD4 (Leu-3a⁺ HLA-DR⁺) 陽性細胞比率、活性化 CD8 (Leu-2a⁺ HLA-DR⁺) 陽性細胞比率を測定し、CD4 (Leu-3a⁺) 陽性細胞比率、CD8 (Leu-2a⁺) 陽性細胞比率、CD4 陽性細胞比率/CD8 陽性細胞比率の検討も行った。

統計学的検討では t 検定を用いた。

結 果

NK 細胞比率の変化を比較すると、腎摘除術後あるいは IFN- α 投与後に低下し、特に M1 群ではその傾向が顕著であった。また、投与前値において M1 群が M0 群より有意に高値を示した (Fig. 1)。

CD4 陽性細胞比率の変化を比較すると、腎摘除術後あるいは IFN- α 投与後に M1 群および M0 群では、有意な上昇を認めた。IFN- α (-) 群では腎摘除術後に変化が認められなかった。CD8 陽性細胞比率については、腎摘除術後あるいは IFN- α 投与前後に特に有意の変化を認めなかった (Fig. 2)。

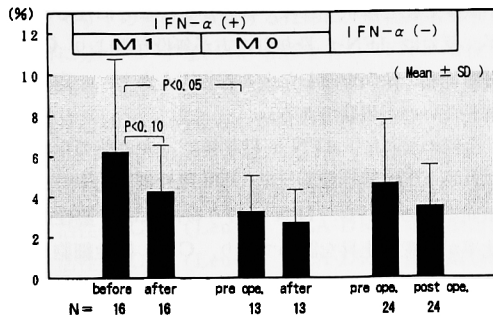


Fig. 1. Changes in percentage of NK cells. Percentage of NK cells showed a tendency to decrease after nephrectomy and the administration of INF- α .

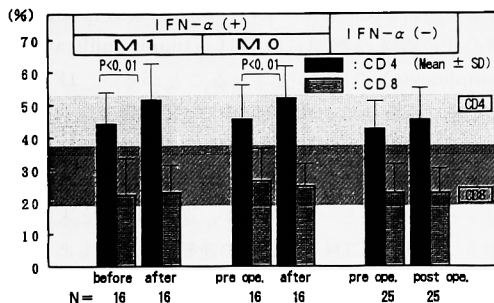


Fig. 2. Changes in percentages of CD4 positive cells and CD8 positive cells. Percentage of CD4 positive cells showed a significant increase after the administration of INF- α . Percentage of CD8 positive cells showed no particular changes.

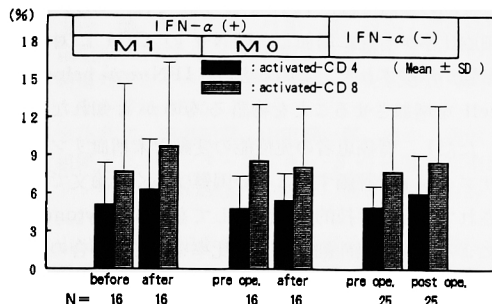


Fig. 3. Changes in percentages of activated CD4 positive cells and activated CD8 positive cells. Percentage of activated CD4 positive cells showed a tendency to increase slightly. Percentage of activated CD8 positive cells showed no particular changes.

活性化 CD4 陽性細胞比率の変化を比較すると、腎摘除術後あるいは IFN- α 投与後に、有意差は認められなかったものの、やや上昇傾向を認めた。活性化 CD8 陽性細胞比率の変化を比較すると、腎摘除術後

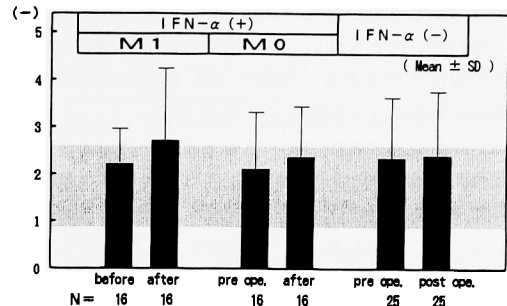


Fig. 4. Changes in the ratio of percentage of CD4 positive cells/percentage of CD8 positive cells. The ratio of percentage of CD4 positive cells/percentage of CD8 positive cells showed a tendency to increase slightly.

あるいは IFN- α 投与前後で有意な変化は認められなかった (Fig. 3).

CD4 陽性細胞比率/CD8 陽性細胞比率の変化を比較すると、腎摘除術後あるいは IFN- α 投与後に、有意差は認められなかったが、やや上昇傾向を示した。また、基準値と比較してみると、今回検討した腎癌患者では、CD4 陽性細胞比率/CD8 陽性細胞比率は比較的高く保たれていた (Fig. 4).

考 察

腎摘除術あるいは IFN- α を投与した場合の生体内の免疫系の変化を知る目的で末梢血中のリンパ球サブセットの変動の検討を行った。腎摘除術後あるいは IFN- α 投与後に低下を示したのが、NK 細胞比率であった。IFN- α 投与後増加したのが、CD4 陽性細胞比率と、CD4 陽性細胞比率/CD8 陽性細胞比率であった。CD8 陽性細胞比率には変化を認めなかった。

今回のわれわれの検討では、NK 細胞比率は腎摘除術後あるいは IFN- α 投与後に低下を示したが、上昇とする報告¹⁻³⁾ もあれば、低下とする報告^{4,5)} もあり、一定していない。

麻酔や手術侵襲が生体に免疫的抑制状態を惹起するの報告⁶⁻⁸⁾ も多く、NK 細胞の活性化の低下⁹⁾ などがいわれている。NK 細胞の動きに関しては、測定時期、IFN の種類や投与期間も問題になってくるので、同一には評価しにくいところではある。

IFN の投与では、Pre-NK 細胞から成熟 NK 細胞への成熟過程が増強され、一時的に NK 活性が増強するが、長く IFN を投与すると、NK 細胞が徐々に枯渇して NK 活性が低下してくるともいわれている。しかし、今回の IFN- α 投与後の検討時期は、投与後平均12~13週経過の時点であり、NK 細胞が

枯渇するとは思われない。

癌の進行にともない NK 活性の低下が認められるとの報告¹⁰⁻¹²⁾もある。今回の NK 細胞の割合が、転移のない症例より転移のある症例で高いという結果は、一見矛盾するかのようにみえる。転移のある症例では、NK 細胞比率が高いにもかかわらず、個々の NK 細胞の細胞障害能は低下していることも考えられる。が、逆に転移のある症例でも入院直後および IFN- α 投与後平均12週経過の時点では、まだ患者の状態も安定しており、NK 細胞の細胞障害能を発揮すべき場所が多いため高くなるとも考えられる。転移のない症例では腫瘍切除により、NK 細胞の target cell がなくなり、NK 細胞が多くは必要なくなったため、低いのかもかもしれない。

CD4 は helper T cell と suppressor inducer T cell であり、どちらの性格が強いかはまだ不明である。helper cell は B cell が plaque 形成細胞に分化するのを助け、suppressor inducer cell は stem cell から suppressor cell を生じる働きを有する。

術前の IFN- γ 投与で CD4 陽性細胞数の上昇を認めたとの報告¹³⁾があるが、IFN- γ 投与後3日目には上昇するも、その後投与を続けると減少傾向を示したとの報告¹⁴⁾もあり、IFN 投与後の CD4 陽性細胞数の動きは一定していない。CD4 が抗原提示細胞からの信号を受けて IL-2 を分泌し、CD8 の活性化を促す以外に、自ら killing activity を有するとの報告¹⁵⁾がある。そうとすれば今回のわれわれの検討でみられた IFN- α 投与後の CD4 陽性細胞比率の上昇は IFN- α が有効に作用したと判断できる結果である。

今回の検討からは、IFN- α 投与前働いていた NK 細胞が、投与後減少し、NK 細胞とその役割を交代するかのように、CD4 陽性細胞の割合が増加してくる傾向がみられた。IFN- α 投与により、MHC class I 発現の増強がおこるといわれており¹⁶⁾、また、MHC class I 表出と NK 感受性の逆相関もいわれていることから¹⁷⁾、IFN- α 投与後の生体免疫機構としては、NK 細胞に代わって、T細胞系が主体となることを示しているのかもしれない。

CD8 は suppressor T cell と cytotoxic T cell であるが、どちらの性格が強いかは、これもいまだ不明である。今回のわれわれの検討では特に有意の変化は認めなかったが、術前の IFN- γ 投与により術後経過で CD4 に比較して相対的 CD8 の減少をみたとの報告¹⁸⁾がある。これを術前の IFN- γ 投与により suppressor T cell の術後上昇が抑制された結果 CD8

が減少したと解釈すれば、都合がよいことになる。

が、反対に IFN- γ 投与群の方が無投与群より CD8 が術後高い傾向を示したとの報告¹²⁾もあり、一定の見解がないのが現状である。

今回の検討で、IFN- α 投与後に、免疫能の指標とされる CD4 陽性細胞比率/CD8 陽性細胞比率の上昇傾向を認めている。IFN- α 投与後に CD4 陽性細胞比率が有意の上昇を認めており、CD8 陽性細胞比率に有意の変化をみていないことより、当然の結果ではある。が、術前 IFN- γ 投与後の検討で、CD4/CD8 の上昇が CD4 に比較して相対的に CD8 の減少によるとの報告¹⁸⁾もある。

全身的な免疫機構が、必ずしも局所での腫瘍と担癌患者の関係を反映していない¹⁹⁾ため、最近では腫瘍局所の免疫機構の解明には TIL (tumor infiltrating lymphocyte) の検討がなされることが多い。IFN- α の術前7日投与により TIL 中の CD4 陽性細胞比率が有意に上昇し、CD8 陽性細胞比率は変化を認めなかったとの報告²⁰⁾があり、今回のわれわれの末梢血中リンパ球の結果と一致する。が、逆に TIL と末梢血中リンパ球の CD4/CD8 比の逆転の報告²¹⁾もあり、一定していない。

CD4 陽性細胞比率、CD8 陽性細胞比率のどちらにしても、さらに機能的 T cell の分析が必要である。今後 CD4 を helper T cell と suppressor inducer T cell に、CD8 を suppressor T cell と cytotoxic T cell に分けて検討する予定である。

今回の検討では、IFN- α 投与群では、CD4 陽性細胞比率が有意に増加し、IFN- α の CD4 に対する影響が示唆された。このことは、IFN- α が helper T cell を増加させることを物語るものかも知れない。

ただし、腎癌患者の免疫能の変動を末梢血リンパ球サブセットで評価することの困難は多くの論文で指摘されている。手技的な問題としても flow cytometry による CD4 陽性細胞などの比率を論じる場合の数%の違いは容易に生じるといわれており、そのような状況で有意差を出すことに問題はあるのかもしれない。なお、測定値に関しては、絶対数で表す場合もあるが、リンパ球中の陽性率(百分率)の方が推奨されており²²⁾ 本論文では百分率で表した。

今後さらに、転移を有する症例の予後および治癒切除症例の再発と、末梢血リンパ球サブセットの関連の検討も行っていく予定である。

結 語

腎摘除術および IFN- α 投与前後の末梢血リンパ球

サブセットの変動を検討するために、腎癌患者57名を3群に分けた。すなわち、転移を有し IFN- α を投与した16名、転移はなく IFN- α を投与した16名、転移はなく、IFN- α 非投与の25名の3群である。

Two color flow cytometry により免疫学的パラメーターすなわち NK 細胞 (Leu-11⁺ Leu-7⁻) 比率、活性化 CD4 (Leu-3a⁺ HLA-DR⁺) 陽性細胞比率、活性化 CD8 (Leu-2a⁺ HLA-DR⁺) 陽性細胞比率を測定し、CD4 (Leu-3a⁺) 陽性細胞比率、CD8 (Leu-2a⁺) 陽性細胞比率、CD4 陽性細胞比率/CD8 陽性細胞比率の検討を行った。

腎摘後および IFN- α 投与後に、NK 細胞比率は低下する傾向を認めた。IFN- α 投与後、CD4 陽性細胞比率が有意に上昇を示し、活性化 CD4 陽性細胞比率と CD4 陽性細胞比率/CD8 陽性細胞比率はやや上昇傾向をみた。CD8 陽性細胞比率と活性化 CD-8 陽性細胞比率は特に変化を認めなかった。IFN- α 投与と CD4 陽性細胞比率の変化の関連を認め、このことは、IFN- α が helper T cell を増加させることを物語るものかも知れない。

本論文の要旨は第1回腎癌研究会(1991年、金沢)および第80回日本泌尿器科学会総会(1992年、東京)で発表した。なお、検体の収集には大塚製薬津出張所の飯塚伸司氏の御協力を頂いたことを感謝する。

文 献

- 丸茂 健, 早川正道, 村井 勝, ほか: 進行性腎細胞癌に対するヒト α 型インターフェロンの抗腫瘍効果とその免疫学的検討. 日泌尿会誌 76(7): 965-973, 1985
- 米花孝文, 田中紀章, 山田潤一郎, ほか: 遺伝子組換えヒトインターフェロン- β の癌患者末梢血リンパ球のNK活性への影響. 癌と化療 12(2): 362-363, 1985
- 山田潤一郎, 田中紀章, 紙谷晋吾, ほか: 遺伝子組換えヒトインターフェロン- γ の癌患者末梢血リンパ球の免疫能におよぼす影響. 癌と化療 13(5): 1946-1952, 1986
- Maluish AE, Ortaldo JR, Conlon JC, et al.: Depression of natural killer cytotoxicity after in vivo administration of recombinant leukocyte interferon. J Immunol 131: 503-507, 1983
- Cuellar AB, Ruiz JLM and Orbacharbouys S: Decreased natural killer cell activity after prolonged administration of interferon in cancer patients. Immunol Lett 10: 137-139, 1985
- Park SK, Brody JI, Wallace HA, et al.: Immunosuppressive effect of surgery. Lancet 9: 53-55, 1971
- Slade MS, Simmons RL, Yunis E, et al.: Immunodepression after major surgery in normal patients. Surgery 3: 363-372, 1975
- Salo M: Effect of anaesthesia and surgery on the number of and mitogen-induced transformation of T- and B-lymphocytes. Ann Clin Re 10: 1-13, 1978
- Tonnessen E, Mickley H and Grunnet N: Natural Killer cell activity during premedication, anaesthesia and surgery. Acta Anaesthesiol Scand 27: 238-241, 1983
- Pross HF and Baines MG: Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. I. The effect of malignant disease. Int J Cancer 18: 593-604, 1976
- Takasuki M, Ramseyer A and Takasugi J: Decline of natural nonselective cell-mediated cytotoxicity in patients with tumor progression. Cancer Res 37: 413-418, 1977
- 深沢 潔: 泌尿生殖器系癌患者における Natural killer 細胞活性の検討—各種癌疾患の進行度と抗腫瘍療法より見た Natural killer 細胞活性の検討—. 日泌尿会誌 79(2): 239-245, 1988
- 大西哲郎, 町田豊平, 増田富士男, ほか: 腎細胞癌の腎摘除術が及ぼす免疫抑制と、術前の IFN- γ 投与が及ぼす効果に関する検討. 日癌治療会誌 26(3): 586-594, 1991
- Kurzrock R, Quesada JR, Talpaz M, et al.: Phase I study of multiple dose intramuscularly administered recombinant gamma interferon. J Clin Oncol 4: 1101-1109, 1986
- Bottomly K: A functional dichotomy in CD4⁺T lymphocytes. Immunol Today 9: 268-274, 1988
- 永田美保: 腎細胞癌組織における MHC 抗原の発現と IFN- α の MHC 抗原発現に与える効果. 日泌尿会誌 84(5): 814-821, 1993
- 菅野明弘, 安保 徹: NK, LAK 感受性とクラス I MHC 表出の逆相関. 臨免疫 21(8): 1294-1300, 1989
- 大西哲郎, 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
- Britten V, Rees RC and Williams JL: Natural killer cell activity and response to phytohaemagglutinin compared with the histological diagnosis of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. Br J Urol 54: 261-266, 1982
- Onishi T, Machida T, Natori T, et al.: Immunological effects of interferon-alpha or gamma on patients with renal cell carcinoma. Assessment of effects of these interfer-

- ons on major histocompatibility complex, tumor-infiltrating lymphocytes and regional lymph node lymphocytes. *Cancer J* 5: 154-161, 1992
- 21) 長瀬 泰, 森山信男, 保坂義雄, ほか: 腎細胞癌患者に於ける腫瘍組織内, 隣接非腫瘍腎組織, 末梢血中の各リンパ球サブセットの比較検討. 日泌尿会誌 82(11): 1781-1789, 1991
- 22) 新保敏和: 免疫パラメーター: 癌患者における臨床的意義とその測定法Ⅱ. リンパ球サブセット. *Biotherapy* 2(3): 618-634, 1988
(Received on October 13, 1993)
(Accepted on March 14, 1994)