

腎細胞癌患者に対する術後補助療法としてのヒト γ 型 インターフェロン投与の長期免疫学的検討

大阪警察病院泌尿器科 (部長: 藤岡秀樹)

三浦 秀信*, 新井 浩樹, 松岡 徹**, 矢澤 浩治***

佐藤 英一, 西村 健作****, 本多 正人, 藤岡 秀樹

LONG-TERM IMMUNOLOGICAL STUDY ON POSTOPERATIVE ADJUVANT TREATMENT WITH INTERFERON-GAMMA IN PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA WHO UNDERWENT NEPHRECTOMY

Hidehito MIURA, Hiroki ARAI, Akira MATSUOKA, Kouji YAZAWA,
Eiichi SATOH, Kensaku NISHIMURA, Masahito HONDA and Hideki FUJIOKA

From the Department of Urology, Osaka Police Hospital

Previously, we reported the short-term immunological effects of postoperative adjuvant interferon-gamma (IFN- γ) administration to renal cell carcinoma patients as determined by three-color flow cytometry. We now report the results of a long-term study on a larger number of subjects.

Thirty-three patients with renal cell carcinoma received a prophylactic intramuscular injection of IFN- γ (300×10^4 units per week) after nephrectomy. We evaluated immunological changes by measuring peripheral blood lymphocyte subsets including activated cytotoxic T lymphocytes (ACTL), cytotoxic T lymphocytes (CTL), activated suppressor T lymphocytes (ASTL), helper T lymphocytes (HTL), activated suppressor-inducer T lymphocytes (AITL), and suppressor-inducer T lymphocytes (SITL). We also estimated the natural killer (NK) activity by a cytolytic test. All 33 patients were examined for at least 12 months after the start of IFN- γ injection, and 18 patients were examined for 30 months including the 6-month period following discontinuation of IFN- γ injection.

We found significant enhancement of the ACTL subset from the second week to the sixth month after the start of IFN- γ injection. On the other hand, we found a significant decrease in the percentage of the HTL and SITL subsets for a long time after the start of injection. NK activity significantly increased throughout the period of administration, and it continued to increase for six months after discontinuation of IFN- γ injection.

(Acta Urol. Jpn. 45 : 79-83, 1999)

Key words: Renal cell carcinoma, Adjuvant treatment, Interferon- γ , Immunological study, Three color flow cytometry

緒 言

腎細胞癌治療の問題点の1つは、術前転移が明らかでない患者に対し根治的と思われる手術が行われたにもかかわらず、術後再発・転移をきたす症例が少なからずあり、その場合確実な治療法が現時点ではないことがあげられる。したがって、術直後から何らかの補助療法を積極的に行うことにより再発・転移のriskを少しでも下げることができれば、臨床的意義は大きいものと思われる。

以前よりわれわれは、腎細胞癌の全身療法として現在のところ最も有効と考えられるインターフェロン(以下 IFN と略す)のうち、IFN- γ を用いて腎細胞癌の術後補助療法を行っているが、投与に伴う末梢血中のTリンパ球サブセットの短期変動については、既に three color flow cytometry を用いて報告した¹⁾。今回、その後の長期変動を分析したので報告する。

対 象 と 方 法

対象は1990年2月から1996年7月までの6年半の間に当科において腎摘除術を施行した症例のうち、術前明らかな転移を有さない腎細胞癌患者で、IFN を継続投与ができ、後記する末梢免疫能の十分なモニタリングが可能であった33例である。男性24例、女性9例、年齢は36歳から82歳で平均59.1歳。患側は右が22

* 現 : 大阪大学医学部泌尿器科学教室

** 現 : 清恵会病院泌尿器科

*** 現 : 県立西宮病院泌尿器科

**** 現 : 大阪労災病院泌尿器科

例, 左が10例, 両側が1例. 病理学的分類は G1 が18例, G2 が15例, pT1 が4例, pT2 が17例, pT3a が10例, pT3b が2例であった. すべての症例に術後補助療法として組換え型ヒト γ 型 IFN (イムノマックス- γ [®], 塩野義製薬) を術後全身状態の回復した約2週間目より開始した. 投与は1回300万単位を週1回筋注し, 2年間継続を原則とした. 末梢免疫能の変化として末梢血 T リンパ球サブセットと natural killer (NK) 活性値の変動を調べた. T リンパ球サブセットの分析は Becton 社の Leu シリーズモノクローナル抗体を用い, 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, flow cytometry を用いて9,000個まで細胞解析を行い, FACScan (Becton Dickinson 社製) にて測定した全リンパ球内での比率にて検討した. 検討した T リンパ球サブセットは, CD8 陽性細胞のサブセットとして活性化細胞障害性 T リンパ球 (activated cytotoxic T lymphocytes: 以下 ACTL と略す)・細胞障害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocytes: CTL)・活性化サプレッサー T リンパ球 (activated suppressor T lymphocytes: ASTL), CD4 陽性細胞のサブセットとしてヘルパー T リンパ球 (helper T lymphocytes: HTL)・活性化サプレッサーインデューサー T リンパ球 (activated suppressor-inducer T lymphocytes: AITL)・サプレッサーインデューサー T リンパ球 (suppressor-inducer T lymphocytes: SITL) の6項目である. 各サブセットの定義は, ACTL (CD8⁺ CD11b⁻ HLA-DR⁺), CTL (CD8⁺ CD11b⁻ HLA-DR⁻), ASTL (CD8⁺ CD11b⁺ HLA-DR⁺), HTL (CD4⁺ CD45RA⁻ HLA-DR⁻) AITL (CD4⁺ CD45RA⁺ HLA-DR⁺), SITL (CD4⁺ CD45RA⁺ HLA-DR⁻) である. また, NK 活性値は ⁵¹Cr 標識ヒト白血病細胞 K562 を標的として ⁵¹Cr 遊離法で測定した²⁾. なお, 末梢血 T リンパ球サブセットと NK 活性値はシオノギバイオメディカルラボラトリーズ (測定責任者: 高野邦彦, 東野 亨) にて測定された. 測定時期は術前担癌状態・IFN 投与前 (術後およそ2週間目)・投与後48

時間・投与後2週間・投与後1カ月・投与後3カ月, 以後3カ月ごとに投与終了後6カ月までとした. 各ポイントと投与前で比較検討し, 統計学的手法として Wilcoxon 検定を用いた. なお, 末梢免疫能の検討は投与後12カ月までを33例, 投与終了後6カ月までを18例で検討した.

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 CD8・CD4 陽性細胞の比率の変動を調べた. CD8 陽性細胞の比率は投与後48時間で投与前の $23.3 \pm 7.4\%$ から $17.9 \pm 7.3\%$ に有意に低下するが, その後は投与前の状態にもどる傾向がみられた. CD4 陽性細胞の比率は逆に投与後48時間で投与前の $52.7 \pm 10.9\%$ から $64.3 \pm 12.6\%$ へ一時有意に上昇するが, その後投与後2週間で $47.5 \pm 11.4\%$ に逆に有意に低下し, 投与終了後6カ月まで一貫して有意差を持って低下していた (Fig. 1).

次に CD8 陽性細胞の各サブセット別の変動を調べた. ASTL と CTL は CD8 陽性細胞の変動とほぼ同様であった. ACTL の変動も CD8 陽性細胞とほぼ同様の変動であったが, 投与前の $6.2 \pm 3.1\%$ が投与後2週間では $7.0 \pm 4.4\%$ にまで有意に高くなり, その後投与後6カ月まで有意差を持って高くなっていた (Fig. 2). CD4 陽性細胞の各サブセットの変動をみると, AITL には有意な変動は見られなかったが, HTL と SITL は CD4 陽性細胞とほぼ同様の変動をしていた. HTL の比率は投与前 $21.8 \pm 5.0\%$ から投与48時間で $24.9 \pm 7.2\%$ にまで一時的に有意に高くなり, 投与後2週間では逆に $19.5 \pm 5.2\%$ に有意に低下, その後は投与後6カ月より12カ月のポイントでは有意差はないものの, その他のポイントでは投与終了後6カ月まで有意に低下していた. SITL の比率も投与前 $22.6 \pm 9.6\%$ から投与後48時間で $27.4 \pm 12.2\%$ にまで一時的に有意に高くなり, 投与後2週間では逆に $20.5 \pm 9.6\%$ に有意に低下, その後は投与後24カ月まで有

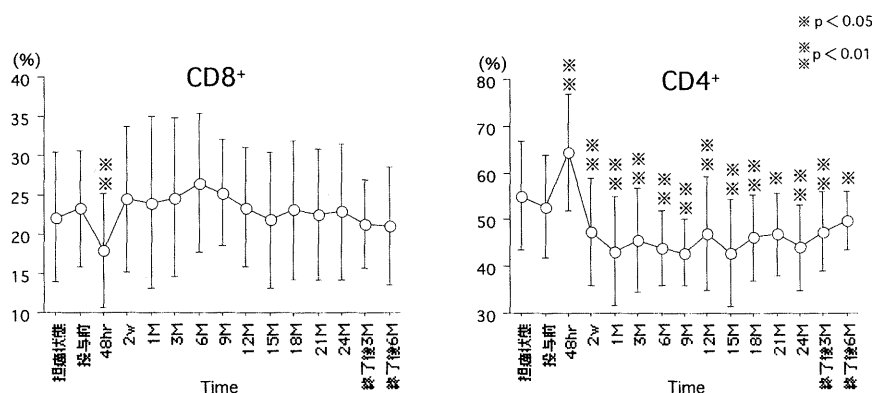


Fig. 1. Changes of CD8⁺ and CD4⁺, before and after the start of IFN- γ .

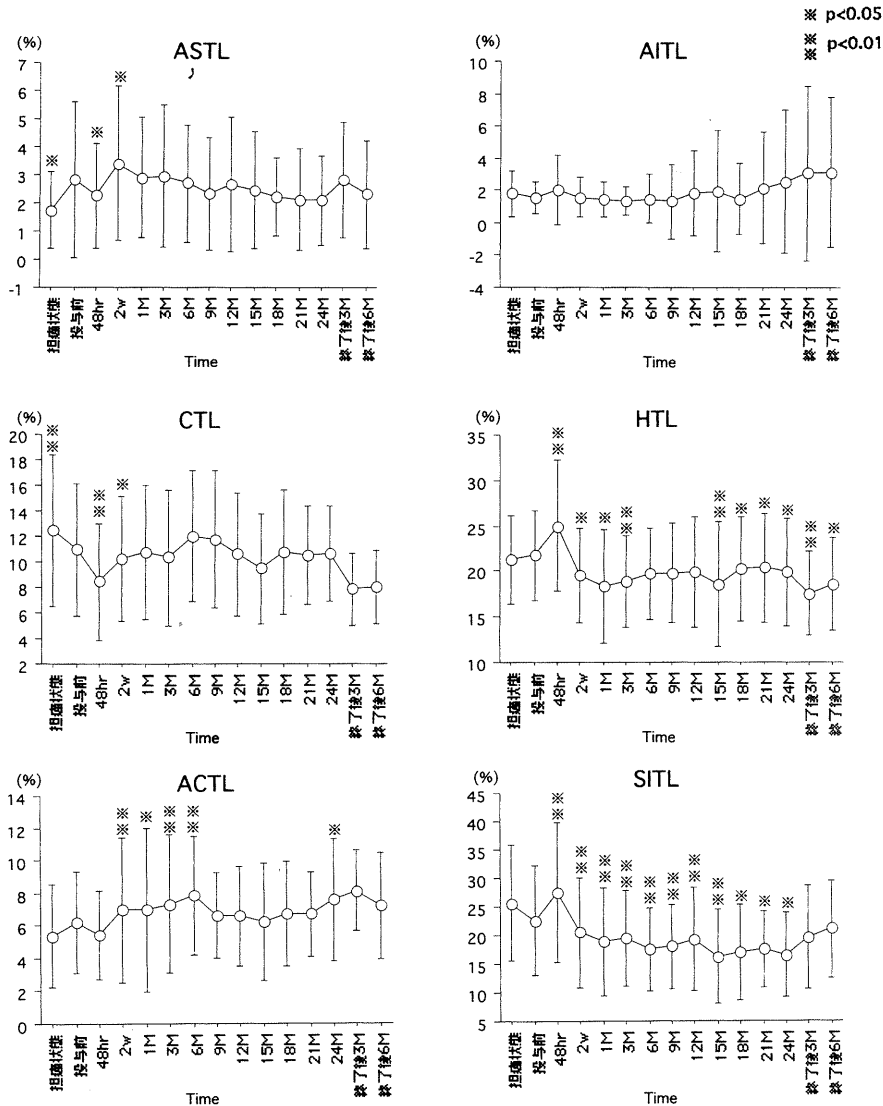


Fig. 2. Changes of several T lymphocyte subsets, before and after the start of IFN- γ .

意に低下していた (Fig. 2).

2. NK 活性値の変動

NK 活性値は投与前 $7.5 \pm 5.0\%$ から投与後48時間では $10.4 \pm 7.1\%$ まで有意に高くなり, その後も一貫

して有意差をもって投与前よりも高く, 投与終了後6カ月の時点でも同様であった (Fig. 3).

以上の各パラメーターの変動を異型度別・pT 分類別で検討したが, いずれの群の変動にも有意差は認めなかった. また, 末梢免疫能の変動を調べた33例中, 5例で経過観察中に再発・転移・癌死が観察されたが, いずれの症例でも臨床経過に相関する特異なパラメーターの変動はみられなかった.

考 察

腎細胞癌は比較的早期から血行性あるいはリンパ行性に癌細胞が播種しやすいといわれており, Gravesら³⁾は low stage の腎癌においても既に大循環系に多数の癌細胞が流入していることを報告している. このことは臨床的に術前転移を認めない症例においても, 症例によっては術後何らかの全身の補助療法が必要であることを示している. 現在のところ腎細胞癌に対す

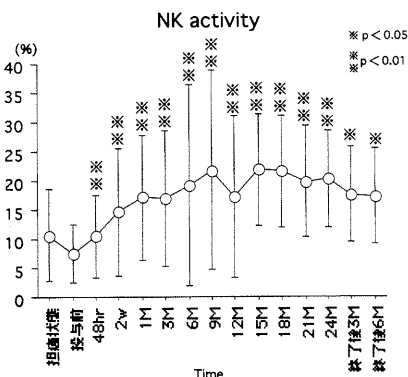


Fig. 3. Change of natural killer (NK) activity, before and after the start of IFN- γ .

る補助療法としては IFN が代表的で、特に 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 や β より優れているとされる^{4,5)}。以上の点より、われわれは1990年2月より腎細胞癌患者の術後に routine に IFN- γ の投与を継続してきた。投与方法・至適投与量については現在のところ一定の見解が得られておらず、免疫賦活効果の維持には長期投与が必要であるとの報告⁶⁾から、われわれは300万単位を週1回外来で簡便に施行できる筋注で2年間継続を基本としてきた。

従来、IFN の抗腫瘍効果を判定する方法として、評価可能病変がない場合、免疫学的手法によるリンパ球サブセットの測定が行われている。IFN- γ 投与後の変動について現在までにも多くの報告があるが、CD4 陽性細胞の増加の報告⁷⁾や減少の報告^{8,9)}、CD8 陽性細胞の増加の報告⁸⁾や減少⁹⁾の報告というように一定の結果は得られていない。この理由として投与量・投与方法が一定でないことがあげられるが、もう一つの理由として、従来の多くの報告は single color flow cytometry 分析を用いていることが考えられる。具体的には CD8 陽性細胞は細胞障害性Tリンパ球とサプレッサーTリンパ球の両者を、CD4 陽性細胞はヘルパーTリンパ球とインデューサーTリンパ球の両者を反映するが、single color flow cytometry 分析ではその判別が不能で、結果的にTリンパ球サブセットの詳細な動態変化の把握は困難と考えられるからである。

われわれは既に three color flow cytometry を用いた IFN- γ 投与後のより詳細な各サブセットの短期変動を報告したが¹⁾、今回さらに症例を増やし長期間の変動について検討したところ、ACTL・HTL・SITL で IFN- γ 投与に伴う有意な変動を確認し、Tリンパ球サブセットの相対的比率の変化は投与中長期間継続していることも確認された。NK 活性値については諸家の報告^{9,10)}と同様 IFN- γ 投与中一貫した有意な上昇が認められた。しかし、NK 活性値の上昇については、投与終了後6カ月までの観察でも投与前に比べ有意に上昇していたこと、IFN を投与せず腎摘除だけで NK 活性値は上昇したとの報告⁹⁾もみられることから、腫瘍摘除に伴う宿主自体の免疫能の変化が関係している可能性も否定できず、今後の検討課題である。また、今回のすべての結果のより正確な評価には、対照群との比較検討が必要であり、今後症例を重ね再検討する予定である。

IFN の免疫調節作用については in vitro では多くの作用が報告されているが¹¹⁾、実際の臨床データと一致しないことも多く、投与方法・投与量にも影響を受けるとされている。今回われわれの IFN- γ 300万単位、週1回、筋注投与によるデータでは、一般的に腎

細胞癌に対する抗腫瘍効果の中心とされる CTL¹²⁾ 特にその活性化ユニットと考えられる ACTL と、NK 細胞¹³⁾の賦活化がみられ、このことは予後の改善を期待させるものと考えられる。しかしその反面、既に IFN- γ 投与後の腎原発巣内浸潤リンパ球と末梢血リンパ球の subpopulation の変動の違いが報告されており¹⁰⁾、IFN- γ 投与に伴う全身的な免疫機構の変化が必ずしも局所での腫瘍と宿主の関係を反映しないこともわかっている。したがって、今回の結果が直ちに術後 IFN- γ 投与の臨床的效果を裏付けるものではなく、IFN- γ の術後予防的投与の意義に関しては今後の prospective randomized study による臨床的検討が必要であることは言うまでもない。

IFN の腎細胞癌に対する主作用が宿主の免疫機構を介するものであるとすれば、宿主免疫能の相違による効果の違いが発生することは容易に考えられる。今回の対象症例の IFN 投与に伴う末梢免疫能の変動でも、標準偏差の大きさにも表れているように症例によるばらつきがみられた。また、IFN の作用のひとつが抗原提示能の増強であることを考えると、永田¹⁴⁾のいうように宿主の HLA 抗原の違いにより IFN に対する反応・効果の違いが生じることも理解できる。今後は現在施行している腎細胞癌患者の HLA typing の結果も含め、さらに各症例を細分化した検討も行っていきたいと考えている。

現段階において、腎細胞癌患者の術後 IFN 投与による効果を予測できる指標がみつければ、より効率の高い IFN 治療が可能となる。しかし、われわれの今回の検討では末梢免疫能をモニタリングできた5例の転移・再発・癌死症例の各パラメーターの変動に共通の特徴的なものではなく、前回の報告¹⁾と同様 IFN- γ 投与の有効性の指標となるパラメーターは末梢免疫能レベルではみつからなかった。

一部の症例に対し IFN 療法が有効な治療法であることは異論のないところと思われるが、IFN 療法に要する膨大な医療費も考えると、有効的な IFN の投与対象・投与量・投与方法・投与期間の早急な確立が待たれるところである。当科では今回の検討に基づき、腎細胞癌患者の術後 IFN- γ の予防的投与に関しては、G1 & pT1 を除く M0N0 症例に対し、ACTL で有意な上昇の継続が確認された術後6カ月間をひとつの目安にして、積極的に継続してゆきたいと考えている。

結 語

術前明らかな転移を有さない腎細胞癌患者33例に対し、腎摘除術後、予防的に IFN- γ を投与し、three color flow cytometry を用いた投与前後の末梢血リンパ球サブセットの変動と NK 活性値の変動を長期的

に調べた.

1. IFN- γ の投与により活性化細胞障害性リンパ球 (ACTL) の比率は有意に高くなり, 逆にヘルパー T リンパ球 (HTL)・サプレッサーインデューサー T リンパ球 (SITL) の比率は有意に低下した. また, この変動は投与期間中長期間持続した.

2. NK 活性値は IFN- γ 投与により投与期間中持続的に投与前に比べ有意に高値を保っていた.

本論文の要旨は第47回日本泌尿器科学会中部総会において発表した. なお本稿を終えるにあたり, 末梢血 T リンパ球サブセットと NK 活性値の測定に関して御協力いただいたシオノギメディカルラボラトリーズの諸氏に深謝いたします.

文 献

- 1) 安永 豊, 西村健作, 三浦秀信, ほか: 腎細胞癌患者の術後補助免疫療法におけるヒト γ 型インターフェロン投与の免疫学的検討—Three color flow cytometry による末梢血リンパ球の変動の解析—. 泌尿紀要 **41**: 85-92, 1995
- 2) 狩野正吾: NK 細胞活性. 臨免疫 **13**: 361-365, 1981
- 3) Graves D, Huben RP and Weiss L: Haematogenous dissemination of cells from human renal adenocarcinomas. Br J Cancer **57**: 32-35, 1988
- 4) 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 γ (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
- 5) Blalock JE, Georgiades JA, Langford MP, et al.: Purified human immune interferon has more potent

anticellular activity than fibroblast or leucocyte interferon. Cell Immunol **49**: 390-394, 1980

- 6) 里見佳昭: 腎癌の治療の現況と今後の課題. 日泌尿会誌 **81**: 1-13, 1990
- 7) 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
- 8) 青柳貞一郎, 村井 勝, 木村文宏, ほか: 進行腎細胞癌に対する Interferon- γ 療法の免疫学的検討. 泌尿紀要 **38**: 1357-1360, 1992
- 9) 川田 望, 小野昌哉, 遠藤真琴, ほか: 腎細胞癌患者の免疫能におよぼす遺伝子組換えインターフェロン γ の影響. 泌尿紀要 **39**: 511-515, 1993
- 10) 大西哲郎: 腎細胞癌原発巣浸潤リンパ球 subset の評価と, IFN- γ 投与が及ぼす免疫的效果に関する研究. 日泌尿会誌 **82**: 216-224, 1991
- 11) 里見佳昭, 福田百邦: 免疫療法. 癌の臨 **42**: 1251-1264, 1996
- 12) Kikuchi K, Ishii Y and Koshida H: Cellmediated immunity involved in autochthonous tumor rejection in rats. Ann NY Acad Sci **276**: 188-206, 1976
- 13) 柳谷仁志, 工藤誠治, 高橋伸也, ほか: 腎細胞癌腫瘍浸潤リンパ球の性状およびインターフェロン α , γ 併用投与が及ぼす影響—リンパ球サブセットによる検討—. 日泌尿会誌 **87**: 928-936, 1996
- 14) 永田美保: 腎細胞癌組織における MHC 抗原の発現と INF- α の MHC 抗原発現に与える効果. 日泌尿会誌 **84**: 814-821, 1993

(Received on June 9, 1998)

(Accepted on November 16, 1998)