

腎細胞癌における遺伝子組換えインターフェロン γ の 末梢血リンパ球サブセットにおよぼす影響と 投与方法の検討について

日本大学医学部泌尿器科学教室（主任：岡田清己教授）

川田 望, 小野 昌哉, 児玉 雅仁, 山中 弥太郎
平方 仁, 平野 大作, 布施 卓郎, 滝本 至得

A STUDY OF EFFECTIVE ADMINISTRATION OF RECOMBINANT INTERFERON- γ IN RENAL CELL CARCINOMA REGARDING IMMUNOLOGICAL INFLUENCE ON PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

Nozomu Kawata, Masaya Ono, Masahito Kodama,
Yataro Yamanaka, Hitoshi Hirakata, Daisaku Hirano,
Takuro Fuse and Yukie Takimoto

From the Department of Urology, Nihon University School of Medicine

Immunological effect of recombinant interferon γ (IFN- γ) was studied in 18 cases of renal cell carcinoma. Sixteen of them were administered IFN- γ as post-operative adjuvant therapy. Two of them were administered IFN- γ for metastatic renal cell carcinoma. All of them were followed for at least 1 year. We divided the patients into two groups. One group subcutaneously received IFN- γ every other day for 16 days, then 4 weeks later every week for one year (group A), and the other group, received alternate subcutaneous IFN- γ every other day for 16 days and every week for 4 weeks (group B).

For immunological testing, peripheral blood lymphocytes were obtained before treatment on day 1, 2 weeks later, 6 months later and 12 months later. The cells were tested for natural killer activity (NK), antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC), positive lymphocytes of CD3, CD4, CD8 and CD11b. Both ADCC and NK activity were increased after therapy, especially in group B. CD3, CD4 and CD8 positive lymphocytes were increased by means of IFN- γ . On the other hand, CD11b-positive lymphocytes could not be elicited in group B.

Tumor regression was observed in 2 cases of metastatic renal cell carcinomas. When clinical responses were observed, both ADCC and NK were elicited as compared with the pretreatment values.

Our findings indicated that ADCC and NK could be elicited in group B.

(Acta Urol. Jpn. 41: 21-26, 1995)

Key words: Renal cell carcinoma, Immunological effect, Interferon- γ , Method of administration of interferon γ

結 言

近年腎細胞癌患者に対してインターフェロンを中心とした治療が行われている^{1,2)}。そして、末梢血における免疫学的パラメーターの推移については、投与後比較的短期間での変動が論じられているが³⁾、長期間

での推移についてはいまだ不明な点が多い。そこで、術後予防的に遺伝子組換えインターフェロン γ （以下IFN- γ ）を投与した16例と、転移病巣を有する2例について、1年間IFN- γ を投与して末梢血における免疫学的パラメーターの推移と、特に評価可能病変を持つ2例については、治療効果とパラメーターの推移の

Table 1. Characteristics of patients (group A)

No	Sex	Age	Robson	Cell type	Architecture	Grade	Followup (mos.)
1	F	63	II	clear	alveolar	2	44 alive
2	M	64	II	clear	alveolar	1	45 alive
3	M	63	II	clear	alveolar	2	46 alive
4	M	54	II	clear	alveolar	2	36 alive
5	F	71	III A	clear	alveolar	2	27 alive
6	F	57	II	clear	alveolar	2	23 alive
7	M	62	II	clear	alveolar	2	13 alive
8	M	61	I	clear	alveolar	1	13 alive

Table 2. Characteristics of patients (group B)

No	Sex	Age	Robson	Cell type	Architecture	Grade	Followup (mos.)
1	M	48	IV	clear	alveolar	1	42 alive
2	M	59	II	clear	alveolar	1	38 alive
3	M	61	I	clear	alveolar	1	36 alive
4	F	51	II	clear	alveolar	2	34 alive
5	M	44	II	clear	alveolar	1	30 alive
6	M	54	III A	clear	alveolar	2	26 alive
7	F	64	I	clear	alveolar	1	19 alive
8	M	61	II	clear	alveolar	1	13 alive

関連性について検討したので報告する。

対象と方法

1. 対象と投与方法

日本大学駿河台病院泌尿器科で1990年7月より、腎細胞癌の診断で原発巣を摘出し、RobsonのステージⅡ以上あるいは組織学的に尿管侵襲の認められた症例で、いずれも手術治療により no evidence of disease となった症例16例を対象とした。16例の詳細を Table 1, 2 に示す。術後予防投与方法には2通りある。IFN- γ 500万 Japan reference unit (以下 JRU) を隔日に16日間、計4,000万 JRU を皮下投与し、その後週に1回500万 JRU を投与する方法をA投与とした。一方B投与は、Groups Ⅰ⁹⁾の方法に準じ、IFN- γ を隔日に16日間、計4,000万JRU の皮下投与を行い、その後週に1回500万 JRU を4回投与し、この投与方法を交互に繰り返す方法である。

A投与群の No. 8 は pVla の症例で、B投与の No. 1 は肋骨に転移がみられ、外科的に摘除しえた症例である。また No. 3 は馬蹄鉄腎に発生したもので、No. 7 は pVla の症例である。他の症例はいずれ

も Table に示すごとく、Robson⁴⁾ のステージⅡ以上の症例である。

評価可能病変を有する2例についての詳細を以下に記す。症例①は、1990年3月28日に腎細胞癌ステージⅢb の診断で根治的腎摘除術を行った。病理組織は clear cell subtype, tubular type, G1 であった。術後 IFN- γ 100万 JRU を週に1度投与していたが、1991年5月より後腹膜リンパ節に局所再発転移がみられ、IFN- γ のB投与を始め、同年8月26日リンパ節郭清術を試みたが、上腸間膜動脈との癒着がみられたため、非治癒切除におわり、術後の残存する腫瘍に対して IFN- γ の投与と、65 Gy の放射線照射を1991年9月から11月まで行い、照射前後で PR の効果が見られた症例である。症例②は鎖骨、腰椎に転移がみられ、1990年12月17日に根治的腎摘除術を施行。病理組織は clear cell subtype, tubular type, G1 であった。術後 IFN- γ のB投与と、鎖骨と腰椎の転移病巣におのおの 50 Gy の放射線照射を1991年1月から3月まで行い、PR の効果がえられた症例である。

2. 免疫学的パラメーターの測定

Table 3. Comparison of immunological effect (mean $\pm$ SD).

		Before	2 Weeks	6 Months	12 Months
CD3	A (n=8)	1178 $\pm$ 195	1084 $\pm$ 431	1324 $\pm$ 311	1397 $\pm$ 341
	B (n=8)	1298 $\pm$ 463	1177 $\pm$ 314	1474 $\pm$ 362	1430 $\pm$ 482
CD4	A	836 $\pm$ 220	762 $\pm$ 295	931 $\pm$ 297	946 $\pm$ 253
	B	848 $\pm$ 295	703 $\pm$ 260	910 $\pm$ 325	904 $\pm$ 393
CD8	A	393 $\pm$ 104*	396 $\pm$ 177	507 $\pm$ 106	581 $\pm$ 236*
	B	468 $\pm$ 221	495 $\pm$ 208	559 $\pm$ 180	554 $\pm$ 220
CD4/8	A	2.2 $\pm$ 0.9	2.0 $\pm$ 0.9	1.7 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 0.7
	B	2.0 $\pm$ 0.6	1.7 $\pm$ 0.8	1.7 $\pm$ 0.7	1.6 $\pm$ 0.6
CD11b	A	430 $\pm$ 183	381 $\pm$ 175	905 $\pm$ 840	433 $\pm$ 250
	B	490 $\pm$ 258	524 $\pm$ 275	637 $\pm$ 287	403 $\pm$ 155
NK (%)	A	13 $\pm$ 7**	27 $\pm$ 16	34 $\pm$ 19**	22 $\pm$ 12
	B	18 $\pm$ 11	18 $\pm$ 11	26 $\pm$ 14	29 $\pm$ 14
ADCC (%)	A	25 $\pm$ 17***	66 $\pm$ 19***	45 $\pm$ 13	52 $\pm$ 22
	B	34 $\pm$ 21	64 $\pm$ 26	53 $\pm$ 17	60 $\pm$ 21

**

p<0.05

末梢血における免疫学的パラメーターの測定を、投与前と投与後2週間、以後6カ月、12カ月に以下の項目について検討した。抗体依存性細胞障害活性（以下ADCC）： ^{51}Cr 標識ニワトリ赤血球を標的として ^{51}Cr 遊離法で測定した⁶⁾。NATURAL KILLER活性（以下NK活性）： ^{51}Cr 標識ヒト白血病細胞K562を標的として ^{51}Cr 遊離法で測定した⁷⁾。リンパ球サブセットは以下の項目についてフローサイトメトリーでえた比率を絶対値になおして検討した。CD3 (MATURE T CELL), CD4 (HELPER/INDUCER T cell), CD8 (SUPPRESSOR/KILLER T cell), CD11b (NK cell)⁸⁾。なお有意差の検定には student's t test を用いて危険率5%以下を有意とした。

3. 効果判定

評価可能病変を有する2例については、腎癌取扱規程⁹⁾に準じて効果判定した。

結 果

1. 術後予防投与症例におけるパラメーターの経時的推移

パラメーターの推移を経時的変化として、投与前、投与後2週間、6カ月、そして12カ月で比較したものがTable 3である。

CD3では、A、B両投与群で投与後2週にやや減少がみられるが、6カ月、12カ月では有意ではないものの増加する傾向が認められた。CD4、CD8につい

て検討すると両投与群ともに増加傾向がみられ、A投与群では投与前と12カ月の間には有意差が認められた。CD4/8でみると両投与群では減少がみられ、これはCD8の増加がCD4の増加をうわまわるための変化であった。つぎにCD11bにおいてはA投与群で6カ月で増加はみられるものの、12カ月経過すると投与前の値に戻る。一方B投与群では6カ月までは増加傾向にあるものの、12カ月経過すると投与前を下回る結果となった。これをNK活性と比較すると12カ月の値がCD11bの関係と逆転し、CD11bではA投与群がB投与群を上回っているものの、NK活性ではB投与群がA投与群を上回る結果となった。

ADCCでは、A投与群において投与前と2週間経過した値に有意差が認められたが、6カ月、12カ月と経過するとその活性値は減少した。B投与群ではその減少はA投与群と比較して少なく、一度高められた活性値が維持できていることが示された。

2. 治療効果とパラメーターの関係について

評価可能病変を有する2例について、治療効果とパラメーターの推移との関係について検討した。症例①のパラメーターの推移をFig. 1に示すが1991年5月にADCCの低下が認められ、同時期に後腹膜リンパ節に再発転移が出現した。その後IFN- γ のB投与を開始し、活性値が上昇した時点で1991年8月26日前述した手術、そして残存腫瘍に対して65 Gyの放射線照射を行った。Fig. 2に示すように、手術後1カ月

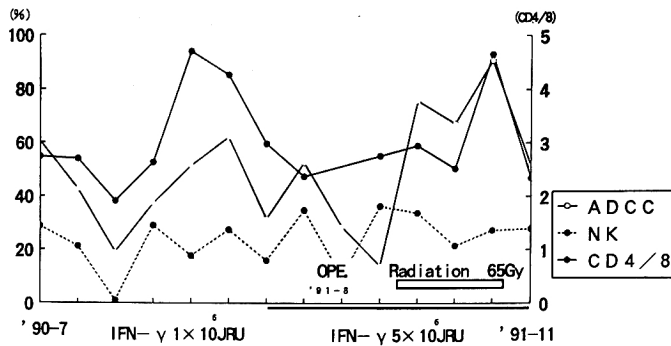


Fig. 1. Change of parameters (case ①)

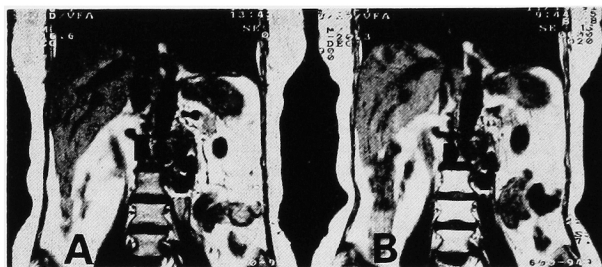


Fig. 2. Case ①, A: before treatment. Coronal MRI image shows enlarged lymph nodes (arrow). B: one month after treatment. The size of tumor was reduced by 61% (arrow).

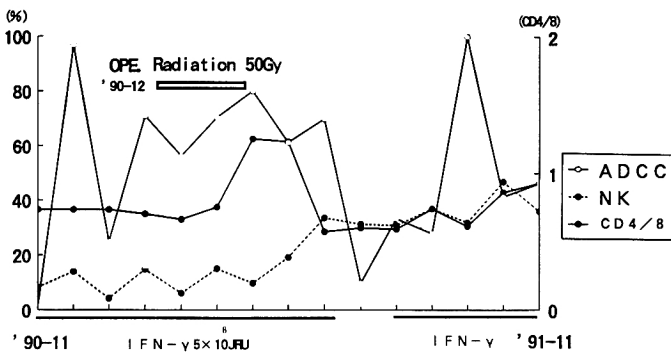


Fig. 3. Change of parameters (case ②)

(Fig. 2A) と照射後 (Fig. 2B) で比較すると、61% の縮小率がみられ PR と判定した。この間、ADCC は局所再発転移が認められた時点より高い活性値を維持でき、一方 NK 活性は投与方法変更前と比較して変化がみられなかった。

PR と判定後 1 年 7 カ月経過した 1993 年 5 月同部位の増大がみられ、同年 10 月癌死した。

つぎに症例②の経過を Fig. 3 に示すが、投与前に ADCC は 1 % と低く、投与後速やかに活性値の上昇が認められた。その活性値は腎摘除術後、鎖骨、腰椎

の骨転移病巣におおの 50 Gy の放射線照射の治療期間を通して高い活性値を維持できた。また肝機能障害のために IFN- γ を中断すると、ADCC は減少するが NK 活性に変動はみられなかった。その後肝機能が回復し、IFN- γ の B 投与を再開すると、ADCC は上昇し始めた。また NK 活性は中断中も上昇した活性値は維持されたままで、再開後さらに上昇した。Fig. 4 に治療前 (Fig. 4A) と開始後 4 カ月後 (Fig. 4B) の CT を示すが、転移病巣は骨硬化も良好で PR と判定し、同様の治療を行った鎖骨の変化を併せ

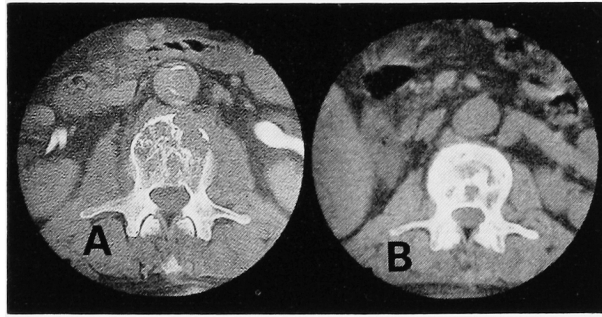


Fig. 4. Case ②, A: before treatment. Axial CT image reveals lumbar osteolytic lesion. B: four months after treatment. Osteolytic lesion was changed to ossifying lesion.

て PR と判定した。

しかし判定後 1 年経過した 1992 年 5 月より骨盤への転移が認められ、放射線照射 50Gy と IFN- γ の B 投与を行ったが、1994 年 2 月癌死した。

考 察

腎細胞癌の根治手術後に行う補助療法の適否については、いまだ明確な結論がえられていない。しかし術後に転移病巣などの評価可能病変のない症例でも、血管侵襲や腎被膜外への癌細胞の浸潤が組織学的に認められた場合、インターフェロンをはじめとして何らかの補助療法を行うのが現状である⁹⁾。

一方で評価可能病変がない場合、その治療の効果を末梢血における免疫学的パラメーターの推移に求めざるをえない。Kurrock ら¹⁰⁾は、IFN- γ を筋肉内投与して、15日間の経過から OKT4 の相対値での減少と、それに伴う 4/8 比の減少および、NK 活性値のピークが 15日目に認められることを報告している。また丸茂ら¹¹⁾は、IFN- γ を静脈内投与して、ADCC 活性の上昇が 2 週から 4 週にかけて認められることを報告している。しかし、術後にインターフェロンを投与する場合、里見ら⁹⁾が述べているように、短期間ではなく長期間にわたり投与する必要がある。従って、①投与初期に上昇した各種免疫学的活性値がいつまで保持できるのか、②長期間投与した場合どのような変化が免疫学的パラメーターにみられるのか、この 2 点について考察を行った。

1. 活性値の推移について

インターフェロンの投与により、ADCC 活性、NK 活性をはじめとして、各種免疫学的パラメーターに変動がみられるが、その中でも IFN- γ の影響を考慮すると、マクロファージを主体とした変動が期待される。事実、IFN- γ は定住マクロファージが活性化

マクロファージへと変化する過程で、応答マクロファージから初期活性化マクロファージへと変化、誘起させるものとして知られている。さらには、ADCC 活性を担う細胞としては、標的細胞と結合可能な細胞は、応答、初期活性化、活性化マクロファージが挙げられるが、そのなかでも、標的細胞を障害可能な細胞は、初期活性化および活性化マクロファージとされている¹²⁾また評価可能病変を有する 2 例はいずれも放射線治療を併用しているが、小川ら¹²⁾によれば 40 Gy から 60 Gy 照射することにより、T リンパ球の絶対数での減少と OKIa1 陽性リンパ球の相対的な増加と、絶対数での減少が指摘されている。しかしそのなかでもマクロファージは放射線抵抗性といわれ、放射線治療中に ADCC 活性の著明な低下がみられなかったことと合致する所見と考えられる。前述したように、症例数は少ないが治療効果とこの活性値の変動には関連性が示唆され、ADCC 活性値を保つことが、術後予防投与においても重要なことと考えられる。結果に示すように、活性値を保つためには週に一度の投与方法では限界があり、B 投与のように間歇的に投与する方法が有効と考えられる。以前術前に IFN- γ を投与して、CD8 ならびに CD11b を中心とした腫瘍内浸潤リンパ球が多くみられることを報告しているが¹⁴⁾、腫瘍内浸潤活性化マクロファージ等の検討が今後の検討課題であると考えられる。

NK 活性について、Grups ら⁹⁾は遺伝子組換え IFN- γ 500 万単位を 8 日間筋肉内投与する方法を 4 週間毎に 5 回から 6 回繰り返す方法を行い、その活性値は投与周期に併行して上昇することを報告しているが、今回の検討では、NK 活性において投与周期に併行して変動はみられなかった。このことは投与方法の相違に起因するものと考えられる。

2. パラメーターの変動について

一般にインターフェロンを投与することにより、CD4/8 が上昇することが知られている⁹⁾。しかし今回の結果に示すように減少する傾向が認められた。この現象には2通りの原因が考えられる。すなわちCD4 が減少するためにCD4/8 が減少すること、CD8 がCD4 を上回るためにCD4/8 が減少することがあげられる。両者の可能性について検討すると、A投与群ではCD4、CD8ともに増加する傾向がみられた。その増加は、CD8がCD4のそれを上回っていたために、CD4/8では減少し、一方、B投与群においても同様の傾向がみられたことから、後者が原因と考えられる。このことを有効例から検討すると、症例①については、有効の臨床効果がえられた時点で、2以上を示していたCD4/8は、1以下に減少して、症例②についても、1以上を示すことはなかった。すなわち、CD8の上昇がCD4の上昇を上回るためと考えられる。CD8にも細胞障害性T細胞とサブレッサーT細胞があり、今後両者を分別し検討する必要があると考えられる。

今回はIFN- γ の1年間の投与期間中の免疫学的パラメーターの推移について検討したが、NK、ADCC活性の上昇がどの程度まで高められた者が、再発転移をしないのか、また、どのサブセットが治療前値よりどの程度まで増加動員された者が再発転移しないのか、投与終了後も長期にわたって経過観察を行い、IFN- γ の再発転移予防効果ならびに免疫学的パラメーターの有用性を検討し明らかにしていく予定である。

結 語

1. 術後IFN- γ の周期的投与(B法)を1年間再発転移予防目的で行い、ADCC活性は投与2週後に上昇し、NK活性は6カ月後に上昇する傾向にあり、1年後まで持続した。
2. 有意ではないが、持続的投与法(A法)およびB投与法にかかわらず、両活性は1年後で上昇する傾向にあった。
3. CD4/8は投与につれ減少する傾向がみられ、1年後で両投与群ともに、1.6であった。
4. 臨床上有効であった2例は、臨床上の効果と一致して活性値の上昇がみられた。

文 献

- 1) Horoszewicz JS and Murphy GP: An assess-

ment of the current case of human interferons in therapy of urologic cancers. *J Urol* 142: 1173-1180, 1989

- 2) Aulitzky W, Gastl G, Aulitzky WE, et al.: Successful treatment of metastatic renal cell carcinoma with a biological active dose of recombinant interferon-gamma. *J Clin Oncol* 7: 1875-1884, 1989
- 3) Hengst JCD, Kempf RA, KanMitchell J, et al.: Immunological effects of recombinant interferon- α 2 in cancer patients. *Biol Response Mod* 2: 516-527, 1983
- 4) 日本泌尿器科学会, 日本病理学会, 日本医学放射線学会編: 泌尿器科・病理・放射線科 腎癌取扱規約 第一版 pp 45, 金原出版, 1983
- 5) Grups JW and Frohmuller HFW: Influence of cyclic interferon gamma on lymphocytes and subpopulations in patients with renal cell carcinoma. *Urology* 35: 111-113, 1990
- 6) 日沼州司, 多田正人, 熊谷勝男: 51Cr 標識抗体を用いた抗体依存性細胞仲介性細胞障害活性(Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)の測定。免疫実験操作法Ⅳ, pp 2443-2451, 日本免疫学会, 金沢, 1979
- 7) 狩野庄吾: NK細胞活性, 臨免疫 13 (suppl. 3): 361-365, 1981
- 8) 石黒 靖, 波多野道弘, 新保敏和: ヒト白血球分化抗原. *Biotherapy* 5: 172-200, 1991
- 9) 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
- 10) Kurzrock R, Quesada JR, Talpaz M, et al.: Phase I study of multiple dose intramuscularly administrated recombinant gamma interferon. *J Clin Oncol* 4: 1101-1109, 1986
- 11) Marumo K, Murai M, Deguchi N, et al.: Immunological effects of recombinant interferon gamma in patients with renal cell carcinoma. *Keio J Med* 39: 97-101, 1990
- 12) Adams DO, Lewis JG and Johnson W: Multiple modes of cellular injury by macrophages: Requirement for different forms of effector activation. *Prog Immunol* 5: 1009-1018, 1984
- 13) 小川恭弘, 前田知穂, 小川由起子, ほか: 癌の放射線治療におけるリンパ球サブセットの検討. *日癌治療会誌* 19: 2138-2145, 1984
- 14) 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

(Received on January 5, 1994)

(Accepted on September 19, 1994)