

OK-432による悪性リンパ腫の interferon- γ (IFN- γ) 産生能に関する研究

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

齋 藤 誠 二

(平成 6 年 1 月 24 日受稿)

Key words : Lymphoma, G-CSF, Prognostic factor

緒 言 対 象

悪性リンパ腫症例には異種抗原に対するリンパ球反応性の低下¹⁻³⁾, natural killer (NK) 活性や ADCC 活性の低下³⁻⁵⁾, PPD 皮膚反応の陰性化³⁾⁶⁾など種々の免疫異常が存在する。一方, T細胞や NK 細胞から産生される interferon- γ (IFN- γ) は, マクロファージやその他の抗原提示細胞の MHC クラス II 抗原の発現誘導⁷⁾, T細胞の分化増殖促進⁸⁾, NK 活性増強⁹⁾, 抗腫瘍活性増強¹⁰⁾¹¹⁾など多彩な作用を有し, 免疫応答に関係する重要な因子とされているが, 悪性リンパ腫症例における IFN- γ 産生能について検討された報告はきわめて少ない。

溶連菌製剤である OK-432は, NK 活性増強¹²⁾¹³⁾, 単球の細胞障害能増強や TNF- α 産生促進¹⁴⁾, 好中球活性化因子の誘導¹⁵⁾などにより抗腫瘍効果を発揮するとされ, biological response modifier (BRM) として種々の悪性腫瘍の治療に用いられている。その作用機序は明確とはいえないが, 本剤によって産生が誘導される IFN- γ などの各種 cytokine による細胞間免疫応答の増強がその抗悪性腫瘍作用と関連することが示されている¹⁶⁾。本論文では, OK-432によって悪性リンパ腫症例の末梢血単核球 (PBMC) の IFN- γ 産生がどの程度誘導されるかを種々の病態において検討した成績と, 治療前の IFN- γ 産生能の予後因子としての意義を解析した成績を述べる。

ホジキン病19例, 非ホジキンリンパ腫79例の計98例を対象とし, 治療前, 化学療法中, 化学療法終了後の完全寛解 (CR) 時, 再発時に分けて IFN- γ 産生能を検討した。なお, IFN- γ 産生能に影響を与えると思われる肝疾患, 糖尿病などの合併症を有する症例と白血化症例は対象より除外した。対照には健康人37名をあてた。また, 産生能の測定は感染症の合併など IFN- γ 産生に影響がないと考えられた時点で行った。予後因子の解析は, 治療前に IFN- γ 産生能を測定し得た非ホジキンリンパ腫33例のうち, 当科にて加療され治療経過を観察し得た32例を対象として行った。

方 法

1. 末梢血単核球 (PBMC) の分離

静脈血を Heparin 加採血後, Histopaque-1077 (SIGMA 社製) を用いた比重遠心法により PBMC を分離し, RPMI-1640 で 3 回洗浄後 10%FCS 加 RPMI-1640 中に浮遊して以下のごとく IFN- γ 産生能を検討した。なお, 付着細胞の影響を検討する目的で, PBMC をプラスチックシャーレにて 37°C, 5%CO₂ 下に 1 時間静置し非付着細胞を回収した。本検体を付着細胞除去 PBMC とし, 同様の培養液に 1 x 10⁶ 個を浮遊して検討した。

2. IFN- γ 濃度の測定

PBMC あるいは付着細胞除去 PBMC 1 x 10⁶ 個を, OK-432 (中外製薬株) を含む 10%FCS 加

RPMI-1640 1 ml中で37°C, 5%CO₂下に培養した後, 3000rpmにて5分間遠心して得られた上清中のIFN- γ 濃度をHuman γ -Interferon RIA Kit (Centocor社製)を用いて測定した。測定はduplicateで行い, 培養後の上清は測定時まで-80°Cで凍結保存した。最初の測定でkitの測定域を越える高値(50U/ml以上)を示した検体は, kitに添付されているIFN- γ 濃度OU/mlの標準液(人加熱血清)にて10~20倍に希釈して測定した。

3. PBMCのIFN- γ 産生能の検討

OK-432濃度と培養時間決定のため健常人4名のPBMC 1×10^6 個をOK-432 0.001, 0.01, 0.1, および1 KE/mlの存在下で培養し, 24, 48, 72, 96時間後に上清中のIFN- γ 濃度を測定した。

4. IFN- γ 産生能に及ぼすG-CSFの影響の検討

PBMCのIFN- γ 産生能に及ぼすG-CSFの影響を検討するため以下の検討を行った。まず, 健常人3名のPBMC 1×10^6 個/mlをOK-432非存在下および0.1 KE/mlの存在下で最終濃度が0, 0.1, 1.0, あるいは10 ng/mlとなるようにG-CSF (Neutrogin: 中外製薬株)を添加し, 37°C, 5%CO₂下に48時間培養後上清中のIFN- γ 濃度を測定した。次に, 健常人の静脈血をHeparinとDextran加採血後, 比重遠沈法により1時間静置して顆粒球層を回収し, RPMI-1640で3回洗浄した顆粒球と同一健常人のPBMCを最終濃度がそれぞれ 5×10^5 個/mlとなるように混合し, PBMC単独の場合と同様にOK-432非存在下および0.1 KE/mlの存在下で最終濃度が0, 1.0, 10, あるいは100 ng/mlとなるようにG-CSFを添加培養後, 上清中のIFN- γ 濃度を測定した。

5. 非ホジキンリンパ腫の予後因子解析

解析した予後因子は, 年齢(<60 vs ≥ 60 歳), 性別, Working Formulation¹⁷⁾による組織型(低 vs 中・高悪性度), 細胞表面形質(T vs B細胞性), Ann-Arbor分類¹⁸⁾による病期(I・II vs III・IV)および全身症状の有無, performance status (PS) (0, 1 vs 3), 骨髄浸潤の有無, 節外病変の有無, 最大腫瘤径(<5 vs ≥ 5 cm), ヘモグロビン (≥ 11.0 vs <11.0 g/dl), 血清

アルブミン (≥ 3.5 vs <3.5 g/dl), 血清LDH (≤ 450 vs >450 IU/l), 治療法(単剤化学療法 vs 多剤併用化学療法 vs 多剤併用化学療法+放射線療法), 治療前IFN- γ 産生能(≥ 100 vs <100U/ml)の15因子で, 各因子についてCR率, 無病生存期間および生存期間の差を解析した。また, IFN- γ 産生能については多剤併用化学療法による寛解率, 化学療法中の発熱頻度も検討した。

6. 統計処理

IFN- γ 産生能はmean \pm 2 SEMで表示し, 平均値の検定はStudent's t検定を, 百分率の検定は χ^2 検定を用いた。予後因子別の無病生存ならびに生存曲線の解析はGeneralized Wilcoxon検定を用い, 生存曲線はKaplan-Meier法により表した。

結 果

1. PBMCのIFN- γ 産生能とOK-432濃度および培養時間との関係

健常人4名のIFN- γ 濃度の平均値を図1に示す。IFN- γ 濃度はOK-432濃度と培養時間に依

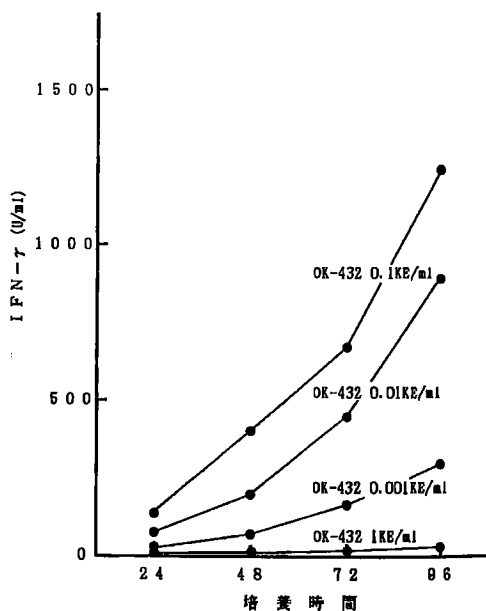


図1 PBMCのIFN- γ 産生能とOK-432濃度および培養時間との関係
PBMC 1×10^6 個/mlの条件下で培養し, 健常人4名の平均値で示した。

存して増加し、OK-432 0.1 KE/ml存在下で最大となり、48時間後には十分評価可能な IFN- γ 濃度に到達した。従って、以後の検討は PBMC 1×10^6 個/mlを用い、OK-432 0.1 KE/mlの存在下で48時間培養後の上清中の IFN- γ 濃度を測定し産生能とした。

2. 悪性リンパ腫治療前の IFN- γ 産生能

1) IFN- γ 産生能

治療前の悪性リンパ腫症例の IFN- γ 産生能 (U/ml) は 153.5 ± 38.4 (N=39) であり、健常人対照 286.5 ± 62.8 (N=37) よりも低値であった (P<0.001, 図2)。

2) IFN- γ 産生能と発症年齢との関係

IFN- γ 産生能と年齢の間には、健常人対照(年

齢24~79歳, 中央値41歳) および治療前の悪性リンパ腫症例 (年齢13~81歳, 中央値56歳) のいずれにおいても弱いながら逆相関 (前者: $r = -.437252$, $P < 0.01$; 後者 $r = -.308604$, $P < 0.05$) が認められた (図3)。

3) IFN- γ 産生能と病期との関係

治療前に検討した38例 (ホジキン病6例, 非ホジキンリンパ腫32例) について IFN- γ 産生能と病期の関係を見ると, I期 190.7 ± 65.6 (N=9), II期 181.5 ± 101.8 (N=9), III期 147.7 ± 67.7 (N=9), IV期 118.7 ± 70.7 (N=11) であり, III・IV期で低い傾向が認められた (図4-A)。また, I・II期症例で100U/ml未満の低値を示したのは18例中3例にすぎなかったのに比べ, III・IV期では20例中11例が100U/ml未満を呈しており, 低値を示したものはIII・IV期において有意に高率であった (P<0.05)。IFN- γ 産生能と Ann-Arbor 分類による全身症状 (発熱, 盗汗, あるいは体重減少) の関係を検討してみると, 全身症状を有する症例で 91.7 ± 60.2 (N=7), 有しない症例では 166.9 ± 43.5 (N=32) と前者で低い傾向が認められた (図4-B)。

4) IFN- γ 産生能と組織型との関係

ホジキン病, 低悪性度非ホジキンリンパ腫ならびに中・高悪性度非ホジキンリンパ腫の3群に分けて検討した。なお, 非ホジキンリンパ腫

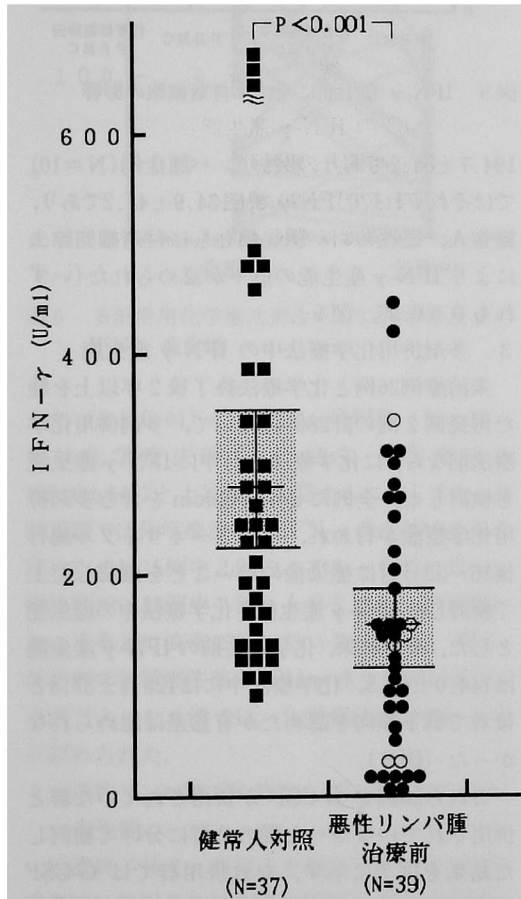


図2 健常人対照と悪性リンパ腫治療前の IFN- γ 産生能
■, 健常人; ○, ホジキン病; ●, 非ホジキンリンパ腫

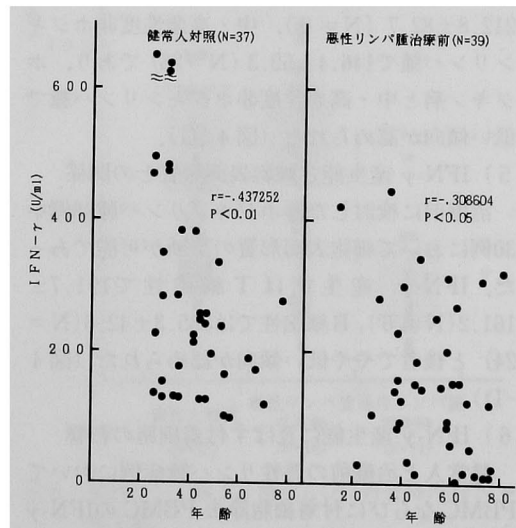


図3 健常人対照, 悪性リンパ腫治療前の IFN- γ 産生能と年齢との関係

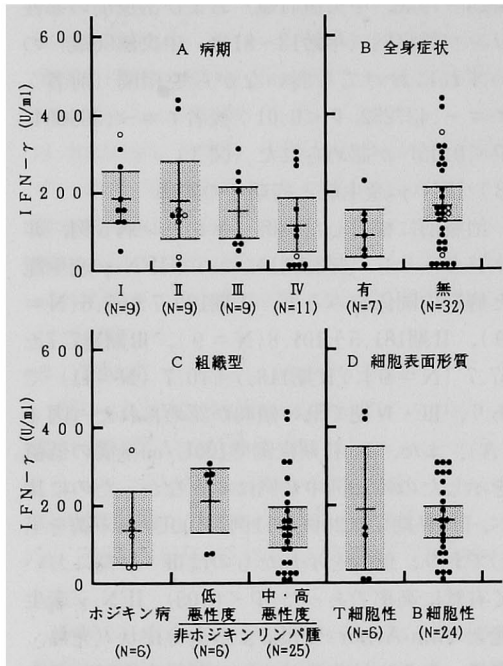


図4 悪性リンパ腫治療前のIFN- γ 産生能と病期、全身症状、組織型、細胞表面形質との関係
○, ホジキン病; ●, 非ホジキンリンパ腫

の2例 (Lymphoepithelioid 1例, Angioimmunoblastic 1例) は Working Formulation による分類が不能であったため検討から除外した。IFN- γ 産生能はホジキン病で 139.0 ± 92.6 (N=6), 低悪性度非ホジキンリンパ腫で 212.8 ± 82.7 (N=6), 中・高悪性度非ホジキンリンパ腫で 146.4 ± 52.3 (N=25) であり, ホジキン病と中・高悪性度非ホジキンリンパ腫で低い傾向が認められた (図4-C)。

5) IFN- γ 産生能と細胞表面形質との関係

治療前に検討した非ホジキンリンパ腫33例中30例において細胞表面形質の診断が可能であった。IFN- γ 産生能はT細胞性で 191.7 ± 161.2 (N=6), B細胞性では 155.3 ± 42.6 (N=24) と後者でやや低い傾向が認められた (図4-D)。

6) IFN- γ 産生能に及ぼす付着細胞の影響

健常人と治療前の悪性リンパ腫症例においてPBMCならびに付着細胞除去PBMCのIFN- γ 産生能を比較すると, 健常人対照 (N=8) ではPBMC 366.6 ± 128.6 , 付着細胞除去PBMC

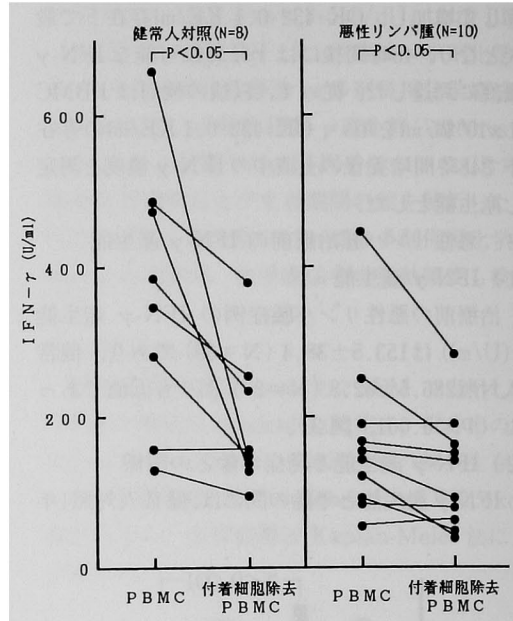


図5 IFN- γ 産生能に及ぼす付着細胞の影響

194.7 ± 64.2 であり, 悪性リンパ腫症例 (N=10) ではそれぞれ 170.7 ± 70.8 , 124.9 ± 48.2 であり, 健常人, 悪性リンパ腫症例ともに付着細胞除去によりIFN- γ 産生能の低下が認められた (いずれも $P < 0.05$, 図5)。

3. 多剤併用化学療法中のIFN- γ 産生能

未治療例26例と化学療法終了後2年以上を経た再発例2例の計28例において, 多剤併用化学療法前ならびに化学療法施行中にIFN- γ 産生能を検討した。全例にdoxorubicinを含む多剤併用化学療法が行われ, その2~4サイクル施行後16~33日目に感染症のないことを確認した上で検討したIFN- γ 産生能を化学療法中の産生能とした。その結果, 化学療法前のIFN- γ 産生能は 144.0 ± 41.5 , 化学療法中には 128.1 ± 37.8 と後者で低下傾向を認めたが有意差は認められなかった (図6)。

これら28例をG-CSFが併用されていた群と併用されていなかった群の2群に分けて検討した結果を図7に示す。なお併用群ではG-CSF $75 \sim 100 \mu\text{g}/\text{body}$ が連日皮下投与されており, いずれもG-CSF投与中に産生能を測定した症例であった。非併用群 (N=15) では化学療法前 154.9 ± 58.3 , 化学療法中 100.7 ± 39.6 と低下

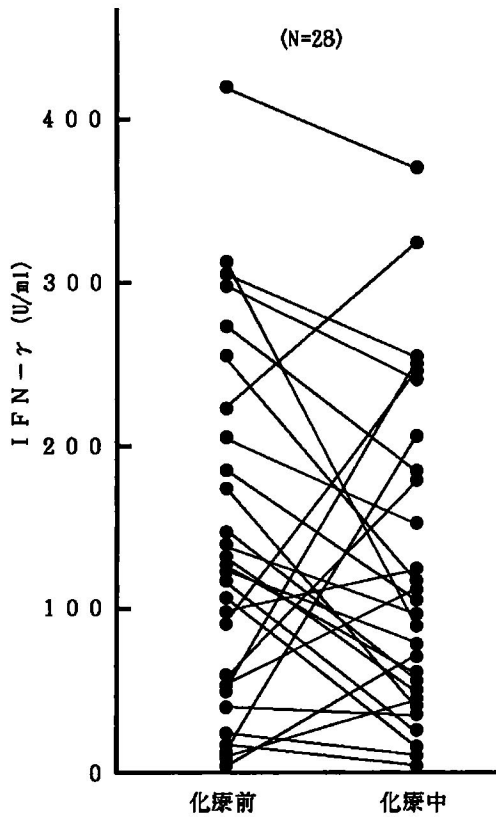


図6 多剤併用化学療法前ならびに化学療法中の IFN- γ 産生能

した ($P < 0.01$) のに比べ、併用群 ($N=13$) では化学療法前 131.4 ± 60.7 、化学療法中 159.6 ± 64.7 と上昇傾向が認められた。また、非併用群では化学療法中に IFN- γ 産生能の上昇を認めたのは15例中2例のみであったのに比べ、併用群では13例中7例に上昇を認め、併用群において有意に高率であった ($P < 0.05$)。特に、併用群で化学療法前の IFN- γ 産生能が 100 U/ml 未満であった6例では、化学療法中全例に上昇が認められた。

4. 悪性リンパ腫 CR 時ならびに再発時の IFN- γ 産生能

治療終了後2ヶ月以上を経た CR 時ならびに再発時に検討された症例の IFN- γ 産生能を図8に示す。CR 時 ($N=54$) には 273.1 ± 41.9 、再発時 ($N=11$) には 111.5 ± 42.2 であり、CR 時には健常人対照 286.5 ± 62.8 ($N=37$) と同等、

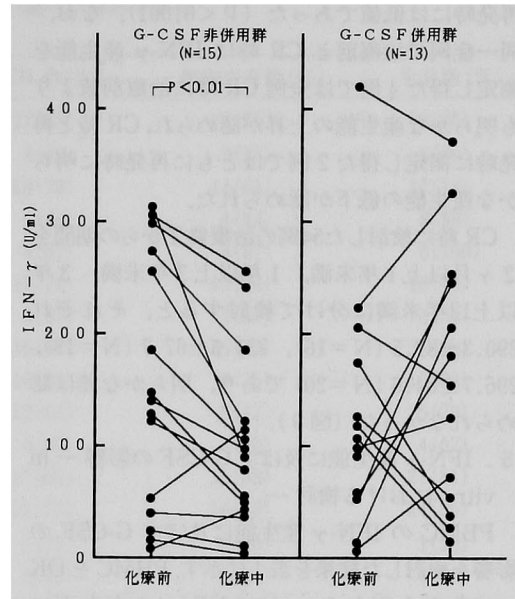


図7 多剤併用化学療法前ならびに化学療法中の IFN- γ 産生能：G-CSF 非併用群と併用群との比較

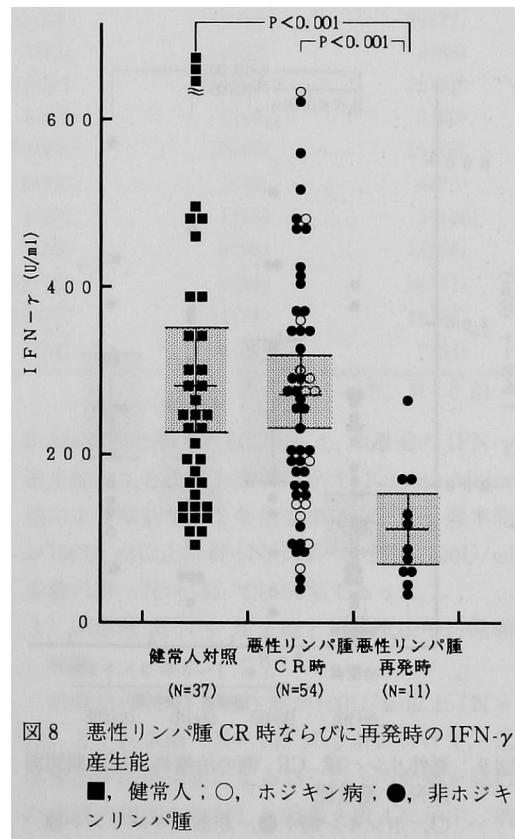


図8 悪性リンパ腫 CR 時ならびに再発時の IFN- γ 産生能
 ■, 健常人; ○, ホジキン病; ●, 非ホジキンリンパ腫

再発時には低値であった ($P < 0.001$)。なお、同一症例で治療前と CR 時に IFN- γ 産生能を測定し得た 4 例では全例 CR 時に治療前値よりも明らかな産生能の上昇が認められ、CR 時と再発時に測定し得た 2 例ではともに再発時に明らかな産生能の低下が認められた。

CR 時に検討した 54 例の治療終了からの期間を 2 ヶ月以上 1 年未満, 1 年以上 3 年未満, 3 年以上 12 年未満に分けて検討すると, それぞれ 290.3 ± 87.5 (N=16), 231.6 ± 67.7 (N=18), 296.7 ± 64.6 (N=20) であり, 明らかな差は認められなかった (図 9)。

5. IFN- γ 産生能に及ぼす G-CSF の影響 — in vitro における検討 —

PBMC の IFN- γ 産生能に及ぼす G-CSF の影響を検討した結果を表 1 に示す。PBMC を OK-432 非存在下あるいは 0.1 KE/ml の存在下に G-CSF を添加培養しても, IFN- γ 産生能の変化は認められなかった。同様に, PBMC と顆粒球を OK-432 非存在下あるいは 0.1 KE/ml の存

在下に G-CSF を添加培養した場合にも, IFN- γ 産生能の変化は認められなかった。

6. 非ホジキンリンパ腫の予後因子解析

1) 治療前 IFN- γ 産生能と多剤併用化学療法による寛解率

当科で加療された非ホジキンリンパ腫 32 例のうち, 化学療法中に肺炎を併発して死亡した 2 例と評価可能病変を持たない 2 例を除く 28 例において化学療法の効果判定が可能であった。このうち doxorubicin を含む多剤併用化学療法が行われた 25 例において治療前の IFN- γ 産生能が 100U/ml 以上の群 (N=15) とそれ未満 (N=10) の 2 群に分けて CR 率を検討した結果, 前者で 73%, 後者では 50% であり, 後者で低い傾向が認められた (表 2)。

2) 治療前 IFN- γ 産生能と各種予後因子別 CR 率, 無病生存期間, 生存期間

予後因子解析の対象とした 32 例についての各種予後因子別 CR 率, 無病生存率, 生存率を表 3 に示す。無病生存期間は全症例を対象とした CR 期間で表し, 化学療法中に死亡した症例は非 CR, 評価可能病変を有しなかった症例は CR として検討した。その結果, CR 率に有意に関係していたのは, 年齢, PS, 治療法であった (い

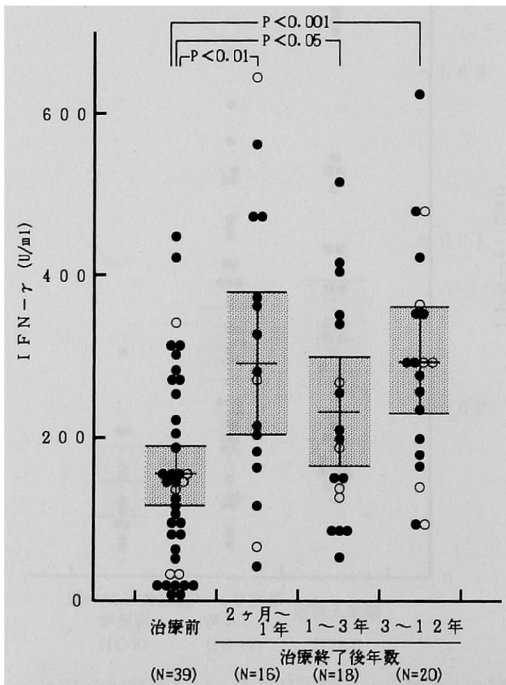


図 9 悪性リンパ腫 CR 例の治療終了後の期間別 IFN- γ 産生能
○, ホジキン病; ●, 非ホジキンリンパ腫

表 1 IFN- γ 産生能に及ぼす G-CSF の影響

健常人	培養系	OK-432	G-CSF 濃度 (ng/ml)				
			0	0.1	1.0	10	100
1	PBMC	-	13.5	12.7	11.0	12.5	-
		+	574.7	560.0	598.3	612.2	-
2	PBMC	-	8.9	10.3	11.8	12.5	-
		+	317.8	299.5	282.2	318.9	-
3	PBMC	-	9.8	7.4	8.0	11.0	-
		+	152.8	130.3	134.6	145.2	-
4	PBMC	-	8.8	-	9.2	9.8	8.6
		+ 顆粒球	115.3	-	116.9	128.4	132.2

表 2 非ホジキンリンパ腫治療前の IFN- γ 産生能と多剤併用化学療法による寛解率

IFN- γ 産生能	症例数	CR	PR
≥ 100 U/ml	15	11 (73%)	4 (27%)
< 100 U/ml	10	5 (50%)	5 (50%)

CR, 完全寛解; PR, 部分寛解

表 3 非ホジキンリンパ腫の予後因子解析

予 後 因 子	症例数	CR 数 (%)	無病生存数 (%)	生存数 (%)
年齢：<60歳	20	17(85)	15(75)	19(95)
\geq 60歳	12	5(42) ^{*1}	3(25)	6(50) ^{*2}
性別：男	23	18(78)	14(61)	17(74)
女	9	4(44)	4(44)	8(89)
組織型：低悪性度	6	4(67)	4(67)	6(100)
中・高悪性度	24	17(71)	13(54)	18(75)
細胞表面形質：T細胞性	6	4(67)	3(50)	3(50)
B細胞性	24	16(67)	15(63)	21(88)
病期：I・II	12	10(83)	9(75)	10(83)
III・IV	19	12(63)	9(47)	15(79)
全身症状：有	6	5(83)	3(50)	4(67)
無	26	17(65)	15(58)	21(81)
P S：0, 1	28	21(75)	18(64)	24(86)
3	4	1(25) ^{*1}	0(0) ^{*2}	1(25) ^{*2}
骨髄浸潤：有	5	2(40)	1(20)	4(80)
無	26	20(77)	17(65)	21(81)
節外病変：有	18	11(61)	7(39)	14(78)
無	13	11(85)	11(85) ^{*1}	11(85)
最大腫瘤径：<5 cm	18	13(72)	11(61)	15(83)
\geq 5 cm	13	9(69)	7(54)	10(77)
ヘモグロビン： \geq 11.0 g/dl	26	17(65)	14(54)	20(77)
<11.0 g/dl	6	5(83)	4(67)	5(83)
血清アルブミン： \geq 3.5 g/dl	27	18(67)	16(59)	22(81)
<3.5 g/dl	5	4(80)	2(40)	3(60)
血清 LDH： \leq 450 IU/l	24	16(67)	15(63)	19(79)
>450 IU/l	8	6(75)	3(38) ^{*1}	6(75)
治療法：単剤化学療法	3	1(33)	1(33)	3(100)
多剤併用化学療法	16	9(56)	8(50)	12(75)
化学療法+放射線療法	13	12(92) ^{*1}	9(69)	10(77)
IFN- γ 産生能： \geq 100 U/ml	19	15(79)	14(74)	18(95)
<100 U/ml	13	7(54)	4(31) ^{*1}	7(54) ^{*2}

* 1, $P < 0.05$; * 2, $P < 0.01$

れも $P < 0.05$). Generalized Wilcoxon 検定による無病生存期間についてみると, PS ($P = 0.007832$), 血清 LDH ($P = 0.032997$), 節外病変の有無 ($P = 0.034846$), IFN- γ 産生能 ($P = 0.037914$) の順で有意であった. なお, IFN- γ 産生能が 100U/ml 未満であった症例では 13 例中 7 例が CR に到達したが, 3 例が再発した. 一方, 100U/ml 以上の症例では 19 例中 15 例が CR となったが, 再発は 1 例のみであった. 同様に生存期間についてみると, PS ($P = 0.001606$), 年齢 ($P = 0.001646$), IFN- γ 産生能 ($P =$

0.004754) の順で有意であった. 治療前の IFN- γ 産生能別生存曲線を図 10 に示す. Kaplan-Meier 法による推計学的 2 年生存率は, IFN- γ 産生能が 100U/ml 以上の群 ($N = 19$) で 92%, 100U/ml 未満の群 ($N = 13$) では 54% であった.

3) 治療前 IFN- γ 産生能と化学療法中の発熱頻度

治療前の IFN- γ 産生能が 100U/ml 以上 ($N = 19$) とそれ未満 ($N = 13$) の 2 群に分けて, 化学療法中に感染症による 38 $^{\circ}$ C 以上の発熱を認めた症例の頻度を検討した結果を表 4 に示す. 前

者では32%であったのに比べ、後者では54%と高い傾向が認められた。なお発熱を認めた症例のうち、化学療法中に肺炎を併発して死亡した2例では、治療前 IFN- γ 産生能はいずれも10U/ml未満と異常低値であった。

考 察

IFN- γ は PBMC を PHA などの mitogen とともに培養した場合に産生され、抗原提示細胞における MHC クラス II 抗原の発現の誘導⁷⁾や ICAM-1 の発現の誘導¹⁹⁾、T細胞の分化増殖促進⁸⁾、CD4⁺T細胞の IL-2 産生促進²⁰⁾と IL-2 R の発現増強²¹⁾、単球の IL-1 産生促進²²⁾、NK 活性増強⁹⁾、抗腫瘍活性増強¹⁰⁾¹¹⁾、B細胞活性化による IgG 2a 産生促進²³⁾、IL-4 による IgE 産生抑制²⁴⁾など免疫応答に関する重要な因子として注目されている。一方、A群溶連菌 Su 株の凍結乾燥製剤である OK-432は PBMC と培養することによって IFN- γ の産生を誘導することが知られているが、その作用にはマクロファージなどの抗原提示細胞との直接接触が必要であり、本剤によって誘導される IFN- γ の産生は産生細胞である Tリンパ球や NK 細胞、ならびにマクロファージなどの抗原提示細胞の機能を反映した結果とされている²⁵⁾。自験例においても健常者、悪性リンパ腫症例ともに付着細胞の除去によって IFN- γ 産生能の低下が認められ、本剤によって誘導される PBMC の IFN- γ 産生能に付着細胞が関与していることが示されたところから、その産生能は前述の免疫担当細胞の機能を総合的に反映した結果と考えられた。

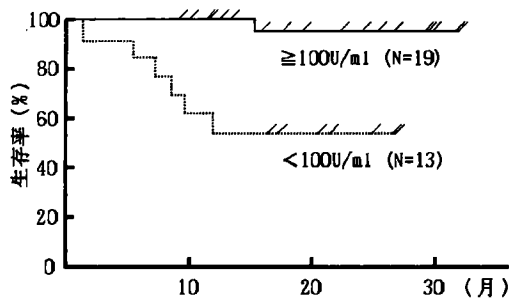


図10 非ホジキンリンパ腫治療前の IFN- γ 産生能別生存曲線

悪性リンパ腫治療前の IFN- γ 産生能は健常人と比べ有意に低値であった。また症例数が少なく有意差は認められなかったが、病期の進行に伴って低下する傾向が認められた。本症においては PHA 幼若化試験の反応性の低下や NK 活性の低下などが病期の進行に伴って強く現れること³⁾⁵⁾や単球の貪食能や走性の低下⁶⁾が報告されている。今回観察された IFN- γ 産生能の低下は、リンパ球やマクロファージなどの免疫担当細胞の機能異常を含め、悪性リンパ腫の免疫能の異常を反映した結果と考えられる。一方、BRM である OK-432は本症における PHA 幼若化試験の反応性の低下や NK 活性の低下を正常化させることが報告されているが⁴⁾²⁶⁾、本剤を用いて IFN- γ 産生能を検討した結果では、治療前、特に病期の進行した症例における免疫能の異常が本剤によっても健常人のレベルまでは是正されないことを示す成績であった。

治療前に検討した症例の IFN- γ 産生能が低値であったのに対し、治療終了後 2 ヶ月以上を経た CR 時に検討された症例の IFN- γ 産生能は治療終了後の期間にかかわらず健常人と同等であった。検討した症例のなかで治療前と CR 時に IFN- γ 産生能を測定し得た症例では、CR 時に治療前値よりも明らかな産生能の上昇が認められた。一方、再発時に検討した症例の産生能は CR 時に検討された症例よりも有意に低下しており、CR 時と再発時に IFN- γ 産生能を測定し得た症例では再発時に明らかな産生能の低下が認められた。以上の成績は、治療によって CR となった症例では免疫異常が改善されること、ならびに OK-432 による IFN- γ 産生は治療前や再発時よりも CR 時に誘導されやすいことを示すものと考えられる。本症では CR 例におい

表 4 非ホジキンリンパ腫治療前の IFN- γ 産生能と化学療法中の発熱頻度

IFN- γ 産生能	症例数	発 熱	
		有	無
≥100U/ml	19	6 (32%)	13 (68%)
<100U/ml	13	7 (54%)	6 (46%)

ても細胞性免疫能を含む種々の免疫異常が存続することが示されているが⁶⁾、内野ら²⁷⁾は寛解維持療法として本剤を投与した群としなかった群での CR 期間は前者で有意に長期であり、CR の維持療法としての本剤の有用性を報告している。このことは本剤によって CR 例の IFN- γ 産生が健常者と同等に認められたことと関連しているのかもしれない。

OK-432による PBMC の IFN- γ 産生能は手術や放射線治療により低下すると報告されているが²⁸⁾、化学療法の影響を検討した報告はない。今回、悪性リンパ腫に広く用いられている doxorubicin を含む多剤併用化学療法の影響を検討した結果、化学療法によって IFN- γ 産生能はさらに低下するが、CR となれば短期間で正常化するものと考えられた。一方、G-CSF が化学療法に併用された場合には、化学療法中にもかかわらず多くの症例でその産生能の上昇が認められた。G-CSF は好中球系前駆細胞の分化増殖の誘導、成熟好中球の機能亢進²⁹⁾が主たる作用であり、NK 活性や LAK 活性などへの影響³⁰⁾を含め好中球以外にはほとんど影響を与えないとされている。しかしながら、その受容体は単球系細胞にも発現が認められること³¹⁾、マウスに G-CSF を投与した場合に好中球の macrophage chemotactic factor や IL-1 産生が亢進すること³²⁾、G-CSF を併用した自己骨髄移植例では sIL-2R の上昇が認められること³³⁾などが報告されており、本剤が T 細胞やマクロファージにも影響を与える可能性が示されている。さらに、マウスの腹水腫瘍に対し G-CSF と OK-432 を併用することにより単独の場合よりも著しい抗腫瘍効果や生存期間の延長が得られたとの報告は³⁴⁾、G-CSF と OK-432 が何らかの相互作用を有する可能性を示している。今回、G-CSF が併用された場合には化学療法による IFN- γ 産生能の低下が抑制され、あるいは逆に上昇するという現象は、G-CSF 単独の作用ではなく OK-432 との相互作用によって生じたものと考えられる。In vitro で検討した結果では、OK-432 による PBMC の IFN- γ 産生に対する G-CSF の直接作用や顆粒球を介する関与は証明できなかったが、in vivo では他の因子が介在した可能性が考

えられた。

非ホジキンリンパ腫の予後因子として、年齢、血清 LDH、病期、節外病変の数、bulky mass など³⁵⁻³⁸⁾の他に、血清中の $\beta 2$ -microglobulin の増加、血清中の sIL-2R や TNF の増加、リンパ節内の HLA-DR の発現量の低下、NK 活性や PHA 幼若化試験の反応性の低下等が認められる症例では予後不良であることが報告されている³⁹⁻⁴³⁾。今回治療前の IFN- γ 産生能別に CR 率を検討した結果、その産生能が低値であった群では CR 率が低く、再発率も高い傾向が認められた。また、治療前の IFN- γ 産生能は他の予後因子とともに無病生存期間や生存期間に有意に関係していた。以上の成績は、IFN- γ が生体内における免疫応答に関する重要な因子であることを考えると、IFN- γ 産生能として表現された免疫異常が治療成績に強く影響した結果と考えられた。今回の成績は単因子解析によるものであり、他の予後因子との関連については明確ではないが、今後 IFN- γ 産生能の予後因子としての有用性についてさらに検討される価値はあろう。また、IFN- γ 産生能が低値であった症例では化学療法中に肺炎などの重症感染症を含め、感染症の合併率が高く、化学療法時には十分な注意が必要と考えられた。

結 論

悪性リンパ腫症例の治療前、化学療法中、化学療法終了後の完全寛解時、再発時の各病態において OK-432 による末梢血単核球の IFN- γ 産生能を、また非ホジキンリンパ腫における治療前の IFN- γ 産生能の予後因子としての有用性を検討し、以下の成績を得た。

1. 悪性リンパ腫症例の治療前の IFN- γ 産生能は健常人に比べ有意に低下しており、病期の進行とともに低下する傾向が認められた。

2. 完全寛解時に検討した症例における IFN- γ 産生能は治療終了後早期から健常人と同等で産生能の低下は認められなかったが、再発時に検討した症例における産生能は健常人に比べ有意に低下していた。

3. 多剤併用化学療法により IFN- γ 産生能は低下したが、G-CSF の併用によりその低下は抑

制される傾向が認められた。

4. 非ホジキンリンパ腫において治療前の IFN- γ 産生能が低値であった症例では完全寛解率が低く、再発率も高い傾向が認められた。また、その産生能が低値であった症例では化学療法中の感染症の合併率が高い傾向が認められた。

5. 治療前の IFN- γ 産生能は無病生存期間および生存期間と有意に関係し、非ホジキンリンパ腫の予後因子のひとつとして有用と考えられた。

以上より、OK-432による IFN- γ 産生能の測定は悪性リンパ腫の免疫異常の把握や非ホジキ

ンリンパ腫の予後の指標として有用と考えられた。また、化学療法と G-CSF の併用が OK-432 による IFN- γ 産生能に影響を与える可能性が示唆された。

本論文の要旨は第54回日本血液学会総会（東京）において発表した。

稿を終えるにあたり御指導、ならびに御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深謝するとともに、終始懇切なる御指導と御助言を頂いた大塚泰亮助教授、林恭一講師に感謝の意を表す。

文 献

- 1) Damle RN, Advani SH and Gangal SG : Impairment in proliferation, lymphokine production and frequency distribution of mitogen-responsive and interleukin-2-producing cells in Hodgkin's disease. *Cancer Immunol Immunother* (1991) **34**, 205-210.
- 2) Joshi NN, Mukhopadhyay R, Advani SH and Gangal SG : Production of Interleukin-2 and expression of Tac antigen in Hodgkin's disease. *Cancer Detect Prev* (1987) [Suppl] **1**, 137-143.
- 3) 友野尚美, 那須 芳, 赤坂清司, 清水達夫, 佐々木正道 : 悪性リンパ腫における細胞性免疫能—病期, 予後との関連—. *内科宝函* (1989) **36**, 143-151.
- 4) Kamio N : Study on natural killer cell activity in patients with malignant lymphoma. *Mie Med J* (1984) **34**, 1-12.
- 5) Metha BA, Advani SH and Nadkarni SJ : Natural killer activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Neoplasma* (1988) **35**, 61-68.
- 6) 中田安成, 片岡幹男, 山下二郎, 佐藤俊雄, 野田憲男, 小林洋三, 大田原保幸, 岸 俊行, 林 恭一, 大塚泰亮, 木村郁郎 : 悪性リンパ腫患者における単球機能の検討. *臨床血液* (1982) **23**, 1689-1695.
- 7) 小出幸夫 : HLA クラスII抗原の発現調節機構. *臨床免疫* (1991) **23**, 718-730.
- 8) Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Jemma C, Giovarelli M and Cavallo G : Interferon- γ is not an antiviral, but a growth-promoting factor for T lymphocytes. *Eur J Immunol* (1988) **18**, 503-509.
- 9) Svedersky LP, Shepard HM, Spencer SA, Shalaby MR and Palladino MA : Augmentation of human natural cell-mediated cytotoxicity by recombinant human interleukin 2. *J Immunol* (1984) **133**, 714-718.
- 10) Barth RJ, Mule JJ, Spiess PJ and Rosenberg SA : Interferon γ and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD 8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* (1991) **173**, 647-658.
- 11) Okadome M, Saito T, Tsukamoto N, Sano M, Kamura T and Nakano H : Potential of human lymph node cells for antitumor activity mediated by interferon gamma. *Cancer* (1991) **68**, 2378-2383.
- 12) Ichimura O, Suzuki S, Sugawara Y and Osawa T : Characterization of mouse natural killer cell activating factor (NKAF) induced by OK-432 : Evidence for interferon- and interleukin 2-independent NK cell activation. *Br J Cancer* (1984) **50**, 97-108.

- 13) Yamaue H, Tanimura H, Iwahashi M, Tani M, Tsunoda T, Tabuse K, Kuribayashi K and Saito K : Role of interleukin-2 and interferon- γ in induction of activated natural killer cells from mice primed in vivo and subsequently challenged in vitro with the streptococcal preparation OK432. *Cancer Immunol Immunother* (1989) **29**, 79–86.
- 14) Bonavida B and Jewett A : Activation of human peripheral blood-derived monocytes by OK-432 (streptococcus pyogenes) : Augmented cytotoxicity and secretion of TNF and synergy with rIFN- γ . *Cell Immunol* (1989) **123**, 373–383.
- 15) Yang KD, Stone RM, Lee CS, Chao TY, Cheng SN and Shaio MF : Effect of picibanil (OK432) on neutrophil-mediated antitumor activity : implication of monocyte-derived neutrophil-activating factors. *Cancer Immunol Immunother* (1992) **35**, 277–282.
- 16) 石田名香雄, 齊藤元男 : OK-432の作用機序をわれわれはいかに解明してきたか? — Effector cell と Cytokine の誘導順序を中心に —. *Biotherapy* (1990) **4**, 155–165.
- 17) The non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification projects : National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer* (1982) **49**, 2112–2135.
- 18) Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW and Tubiana M : Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Res* (1971) **31**, 1860–1861.
- 19) Piela TH and Korn JH : ICAM-1-dependent fibroblast-lymphocyte adhesion : Discordance between surface expression and function of ICAM-1. *Cell Immunol* (1990) **129**, 125–137.
- 20) Frasca D, Adorini L, Landolfo S and Doria G : Enhancing effect of IFN- γ on helper T cell activity and IL 2 production. *J Immunol* (1985) **134**, 3907–3911.
- 21) Johnson HM and Farrar WL : The role of a gamma interferon-like lymphokine in the activation of T cells for expression of interleukin 2 receptors. *Cell Immunol* (1983) **75**, 154–159.
- 22) Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL and Fiers W : Interferons as macrophage-activating factors : III. Preferential effects of interferon- γ on the interleukin 1 secretory potential of fresh or aged human monocytes. *J Immunol* (1985) **134**, 2444–2448.
- 23) Leibson HJ, Geffer M, Zlotnik A, Marrack P and Kappler JW : Role of γ -interferon in antibody-producing responses. *Nature* (1984) **309**, 799–801.
- 24) Vercelli D, Jabara HH, Lauener RP and Geha RS : IL-4 inhibits the synthesis of IFN- γ and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures. *J Immunol* (1990) **144**, 570–573.
- 25) Noda T, Asano M, Yoshie O, Suzuki R, Ebina T and Ishida N : Interferon- γ induction in human peripheral blood mononuclear cells by OK-432, a killed preparation of streptococcus pyogenes. *Microbiol Immunol* (1986) **30**, 81–88.
- 26) 木村郁郎 : 溶連菌剤 OK-432と癌の免疫化学療法の可能性. *癌と化学療法* (1975) **2**, 20–31.
- 27) 内野治人, 白川 茂, 錦織 優 : 悪性リンパ腫寛解維持療法としての溶連菌製剤 OK-432投与の意義. *内科宝函* (1988) **35**, 1–9.
- 28) 松本博城, 泉谷 良, 寺田益士, 野口 淳, 白羽 誠, 久山 健 : OK432によるヒト末梢血単核球の in vitro IFN- γ 産生について — 健常者および担癌患者における検討 —. *J Jpn Soc Cancer Ther* (1989) **24**, 751–758.
- 29) Ohsaka A, Kitagawa S, Sakamoto S, Miura Y, Takanashi N, Takaku F and Saito M : In vivo activation of human neutrophil functions by administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients with malignant lymphoma. *Blood* (1989) **74**, 2743–2748.
- 30) 佃 守, 吉田豊一, 古川 滋, 矢野間俊介, 澤木修二 : 遺伝子組換え型 G-CSF (rG-CSF 注) の免疫能に及ぼす影響. *Biotherapy* (1990) **4**, 232–235.

- 31) 岡村精一：G-CSF 受容体. 造血因子 (1991) 2, 25—33.
- 32) 飯田真一郎, 工藤千恵, 守屋陽一郎, 片岡元行, 齊藤元男, 吉田 彪, 石田名香雄：OK-432と各種サイトカイン併用抗腫瘍効果における好中球の役割. *Biotherapy* (1993) 7, 286—287.
- 33) Dreger P, Grelle K, Eckstein V, Suttorp M, Muller-Ruchholtz W, Loffler H and Schmitz N : Granulocyte-colony-stimulating factor induces increased serum levels of soluble interleukin 2 receptors preceding engraftment in autologous bone marrow transplantation. *Br J Haematol* (1993) 83, 7—13.
- 34) 松岡 節, 飯田真一郎, 伊藤協子, 守屋陽一郎, 齊藤元男, 吉田 彪, 石田名香雄：BAMC-1 腹水腫瘍に対する G-CSF と OK-432 の併用効果. *Biotherapy* (1992) 6, 319—320.
- 35) Coiffier B : Prognostic factors in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Curr Opin Oncol* (1991) 3, 843—851.
- 36) Coiffier B, Gisselbrecht C, Vose JM, Tilly H, Herbrecht R, Bosly A and Armitage JO : Prognostic factor in aggressive malignant lymphomas : description and validation of a prognostic index that could identify patients requiring a more intensive therapy. *J Clin Oncol* (1991) 9, 211—219.
- 37) Cowan RA, Jones M, Harris M, Steward WP, Radford JA, Wagstaff J, Deakin DP and Crowther D : Prognostic factors in high and intermediate grade non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* (1989) 59, 276—282.
- 38) Epelbaum R, Faraggi D, Ben-Arie Y, Ben-Shahar M, Haim N, Ron Y, Robinson E and Cohen Y : Survival of diffuse large cell lymphoma : A multivariate analysis including dose intensity variables. *Cancer* (1990) 66, 1124—1129.
- 39) Aviles A, Zepeda G, Diaz-Maqueo JC, Rodriguez L, Guzman R, Garcia EL and Talavera A : Beta 2 microglobulin level as an indicator of prognosis in diffuse large cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* (1992) 7, 135—138.
- 40) Johnson PWM, Whelan J, Longhurst S, Stepniewska K, Matthews J, Amess J, Norton A, Rohatiner AZS and Lister TA : β -2 microglobulin : a prognostic factor in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Cancer* (1993) 67, 792—797.
- 41) Pui CH, Ip SH, Kung P, Dodge RK, Berard CW, Crist WM and Murphy SB : High serum interleukin-2 receptor levels are related to advanced disease and a poor outcome in childhood non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* (1987) 70, 624—628.
- 42) Kalmanti M, Karamolengou K, Dimitriou H, Tosca A, Vlachonikolis I, Peraki M, Georgoulas V and Kalmantis T : Serum levels of tumor necrosis factor and soluble interleukin 2 receptor as markers of disease activity and prognosis in childhood leukemia and lymphoma. *Int J Hematol* (1993) 57, 147—152.
- 43) Slymen DJ, Miller TP, Lippman SM, Spier CM, Kerrigan DP, Rybski JA, Rangel CS, Richter LC and Grogan TM : Immunobiologic factors predictive of clinical outcome in diffuse large-cell lymphoma. *J Clin Oncol* (1990) 8, 986—993.

**OK-432-induced interferon- γ (IFN- γ) production in patients
with malignant lymphoma**

Seiji SAITO

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

OK-432, a *streptococcal* preparation, is a potent inducer of interferon- γ (IFN- γ) which is known to modulate the immune response. The OK-432-induced IFN- γ production of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was examined in 98 patients with malignant lymphoma. The PBMC were incubated in RPMI-1640 containing 0.1KE/ml OK-432 for 48 hours and the IFN- γ secreted in the supernatant was measured thereafter. Patients at diagnosis or those with relapsing disease showed a decreased production of IFN- γ compared with the healthy controls ($p < 0.001$). The production at diagnosis was related to the clinical stage. The production was significantly decreased immediately after multi-drug chemotherapy. However, it recovered to the level of the healthy controls, once a patient achieved a complete response. At diagnosis, 13 of the 32 patients with non-Hodgkin's lymphoma showed low IFN- γ production. These patients responded poorly to chemotherapy or had early relapse. The 2-year actuarial survival rate was 54% for these patients and 92% for the remainder. There was no decrease in IFN- γ production after chemotherapy in patients treated with G-CSF. These findings suggest that measurement of OK-432-induced IFN- γ production is useful for evaluating the immunological status and predicting the prognosis in patients with malignant lymphoma. They also suggest that G-CSF affects the IFN- γ production *in vivo*.