グリオーマ患者における γ -interferon 産生障害

清水 恵司・宮尾 泰慶・岡本 裕・松井 豊・若山 暁・南條 正季*
石田名香雄*・最上平太郎

Impaired In Vitro Gamma Interferon Production of Peripheral Blood from Patients with Malignant Gliomas

Keiji SHIMIZU, Yasuyoshi MIYAO, Yutaka OKAMOTO, Yutaka MATSUI,
Akatsuki WAKAYAMA, Masaki NANJO*, Nakao ISHIDA* and Heitaro MOGAMI

Department of Neurosurgery, Osaka University, Osaka; *Department of Bacteriology, Tohoku University, Sendai

Abstract

Using the peripheral blood lymphocyte (PBL) interferon induction test, impaired production of gamma interferon (IFN) was investigated in patients with malignant gliomas. 10^7 human PBLs were placed in 5 cm diameter plastic dishes containing 5 ml of RPMI-1640 medium with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and either 5 μ g/ml of OK-432 or 10 units/ml of recombinant interleukin-2 (rIL-2) for 72 hours at 37°C. The culture supernatant was then collected and used for IFN assay which was carried out in FL cells with Sindbis virus. The yields of human IFN were expressed as laboratory units; one laboratory unit corresponds to the quantity necessary to cause 50% inhibition of the viral cytopathic effect. IFN production from PBL of healthy subjects, induced by OK-432 and rIL-2, was $5,367 \pm 525$ and 344 ± 108 units/ml, respectively. The production from patients, however, was 198 ± 66 and less than 40 units/ml, respectively. Human lymphokine-activated killer (LAK) cells were generated by placing 2.5×10^6 PBL/ml in complete medium with 10% heat-inactivated FCS and either 5 μ g/ml of OK-432 or 10 units/ml of rIL-2 for 72 to 96 hours at 37°C. The antitumor cytotoxic activity was estimated in triplicate by 4 hours ^{51}Cr release assays. The *in vitro* cytotoxicity of LAK cells generated from PBL of healthy subjects by rIL-2 and OK-432 against allogeneic glioma (ONS-12) cells was 75% and 50%, respectively. The LAK activity induced in patients by rIL-2 and OK-432 was between 55 and 30%, and between 30 and 7%, respectively. It was noted that very little antitumor activity (*i.e.* 7%) was induced by OK-432 in one patient with an initial low IFN production. The cytotoxic activity of LAK cells induced by OK-432 correlated to IFN production induced from PBL of patients with gliomas.

Key words: interferon, interleukin-2, OK-432, lymphokine-activated killer, glioma

I はじめに

血液脳関門の存在やリンパ組織のないことなどより、脳は免疫学的に特殊な部位であると考えられてきた^{1,9)}。し

かし、脳実質内に Ia 抗原^{11,12)}や HLA-DR 抗原が存在すること^{2,10)}や IL-1 様物質を産生すること⁶⁾などより、脳においても免疫応答が十分に生じる可能性が示唆されるようになった。そこで、グリオーマ患者の末梢リンパ球と

大阪大学脳神経外科 *東北大学細菌学

Address reprint requests to: K. Shimizu, M.D., Department of Neurosurgery, Osaka University, 1-1-50 Fukushima, Fukushima-ku, Osaka 553.

受稿 1985年4月8日 受理 1985年10月10日

OK-432あるいはrecombinant IL-2(以下 rIL-2)との組み合わせによる γ -interferon(以下 IFN)の産生能を調べること、宿主の免疫応答の障害について検討した。

II 対象および方法

対象は健常人5名、組織学的に診断されたグリオーマ患者5例で、いずれもステロイドや化学療法を受けていないものである。リンパ球は末梢血よりFicoll-Paqueを用いて遠心分離し、 2×10^6 個/mlとなるように10%牛胎児血清加RPMI-1640 mediumに浮遊させ、OK-432を0.05 KE/mlあるいはrIL-2(武田薬品工業株式会社)を10単位/mlとなるように加え、72時間培養し、その上清中のIFN活性をFL細胞とSindbisウイルスによる50% cytopathic effect阻止法にて測定した。また、同様にして得られたリンパ球を 2.5×10^6 個/mlとなるよう10%牛胎児血清加 complete mediumに浮遊させ、OK-432およびrIL-2を上記と同濃度に添加して72~96時間培養し、この細胞をlymphokine-activated killer(以下 LAK)細胞とし、その殺細胞能を調べた。標的細胞としては当教室で樹立したグリオーマ株(ONS-12細胞)を用い、4時間の ^{51}Cr 遊離法で測定した。

III 結 果

OK-432で誘導されるIFN活性は、健常人で $5,367 \pm 525$ 単位/mlであるのに対し、グリオーマ患者では 198 ± 66 単位/mlと非常に低い値を示した。またrIL-2によって誘導されるIFN活性は、健常人で 344 ± 108 単位/mlであるのに対し、グリオーマ患者では40単位/ml以下と低値を示した。rIL-2によるIFN産生能はOK-432によるそれに比し全体的に低値を示しているが、いずれにせよ、グリオーマ患者の末梢リンパ球ではIFN産生能が強く障害されていることが判った(Table 1)。

標的細胞としてONS-12細胞を用い、LAK活性を調べたところ、rIL-2で誘導した場合、グリオーマ患者のLAK活性は健常人の40~70%程度であったが、OK-432で誘導した場合、LAK活性はさらに低く、IFN産生能がほとんど認められない患者では数%の殺細胞能しか認められなかった。このことは患者の病態と良く相関していた。ただし、IFN産性能がほとんど認められない患者でも、rIL-2の誘導では健常人の約40%程度の殺細胞能を有していた(Fig. 1)。

IV 考察とまとめ

今回の検討により、リンパ組織のない脳実質より発生するグリオーマ患者において、明らかにIFN産生能は低下

Table 1 Peripheral blood lymphocyte IFN* induction test using rIL-2 and OK-432

	n	(-)	rIL-2	OK-432
Healthy subject	5	17 ± 7	344 ± 108	$5,367 \pm 525$
Patient	5	< 4	< 40	198 ± 66

*IFN indicates gamma interferon. Values are expressed by mean $\pm$ SE units/ml. rIL-2 indicates recombinant interleukin-2.

Fig. 1 Correlation between the antitumor activity of lymphokine-activated killer (LAK) cells and the IFN production. LAK cells and IFN were induced *in vitro* by rIL-2 or OK-432 from peripheral blood lymphocytes of healthy subjects and patients with malignant gliomas. Case 1: a patient in a relatively early stage of disease, Case 2: a patient in an advanced stage. Very little antitumor activity (*i.e.* 7%) was induced *in vitro* by OK-432 in Case 2 with an initial low IFN production. Effector/target ratio=20: 1.

していることが証明された。中舘ら⁸⁾は、肝炎や胃癌患者の場合にも明らかなIFN産生能の低下を指摘しているが、Jurkat細胞より抽出したヒトIL-2に対する反応性の面では健常人と差がなかったと報告している。しかし、グリオーマ患者の場合にはrIL-2に対するIFN産生能も低下していることが示唆された。また、LAK活性について検討してみると^{3,7)}、IFN産生能が極端に低いグリオーマ患者でもrIL-2によるLAK活性は健常人の約40%を示したが、OK-432によるLAK活性は非常に低く、数%であった。この結果については、OK-432によるLAK活性がIFNを介するものであるのか、あるいはLAK細胞がOK-432やrIL-2にそれぞれ主として反応するsubpopulationが存在

するのか、今後検討する余地がある^{4,5)}。また、肝炎患者や胃癌患者ではOK-432に対するIFN産生能の低下が認められるもヒトIL-2に対する反応性は健常人と差がないことから、グリオーマ患者の末梢リンパ球における両薬剤に対する反応性の低下は脳における特殊な免疫応答機構と関連することが示唆された。なお、抑制物質がグリオーマより産生しているかは今後の検討課題である。いずれにしても、グリオーマ患者では内因性のIFN産生能の低下が認められ、またLAK活性も低下していることより、脳実質内に発生したグリオーマが全身の免疫応答に強く関与し、免疫抑制がなされていると推察された。

文 献

- 1) Barker CF, Billingham RE: Immunologically privileged site. *Adv Immunol* 25: 11-15, 1977
- 2) Carrel S, de Tribolet N, Gross N: Expression of HLA-DR and common acute lymphoblastic leukemia antigens on glioma cells. *Eur J Immunol* 12: 354-357, 1982
- 3) Eberlein TJ, Rosenstein M, Rosenberg SA: Regression of a disseminated syngeneic solid tumor by systemic transfer of lymphoid cells expanded in interleukin 2. *J Exp Med* 156: 385-397, 1982
- 4) Farrar J, Benfamin WR, Hilfiker ML, Howerd M, Farrar WL, Fuller-Farrar J: The biochemistry, biology and role of interleukin 2 induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. *Immunol Rev* 63: 129-166, 1982
- 5) Farrar WL, Johnson HM, Farrar JJ: Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2. *J Immunol* 126: 1120-1127, 1981
- 6) Fontana A, Hengartner H, de Tribolet N, Weber E: Glioblastoma cells release interleukin 1 and factors inhibiting interleukin 2-mediated effects. *J Immunol* 132: 1837-1844, 1984
- 7) 石田名香雄, 斎藤元男, 南條正季: OK-432の制癌性 — LAK細胞の誘導 —. *癌と化療* 11: 2681-2690, 1984
- 8) 中館一郎, 佐藤俊一, 野田哲生, 石田名香雄: 慢性肝炎における γ -IFN産生障害. *医のあゆみ* 130: 669-670, 1984
- 9) Raju S, Grogan JB: Immunologic study of the brain as a privileged site. *Transplant Proc* 9: 1187-1191, 1977
- 10) 清水恵司: ヒトグリオーマ培養細胞におけるHLA-DR抗原の発現と抗原提供能との関連. *大阪大医誌* 34: 97-103, 1984
- 11) Ting JPY, Nixon DF, Weiner LP, Frelinger JA: Brain Ia antigens have a bone marrow origin. *Immunogenetics* 17: 295-301, 1983
- 12) Ting JPY, Shigekawa BL, Linthicum DS, Weiner LP, Frelinger JA: Expression and synthesis of murine immune response associated (Ia) antigens by brain cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3170-3174, 1981

[別刷請求先: 〒553 大阪市福島区福島1-1-50, 大阪大学脳神経外科, 清水恵司]