日消外会誌　29（9）：1900～1910，1996年

RT-PCR法を用いたbiological response modifiersによるサイトカインmRNA誘導の解析

岡山大学第1外科
上　平　　裕　樹

Biological response modifiers（BMR）によるサイトカイン誘導機序を解明する目的で，ヒト末梢血単核球をOK-432あるいはpolysaccharide　K（PSK）で刺激し，サイトカインmRNAの発現をreverse transcription-polymerase chain reaction（RT-PCR）を用いて経時的に解析した．IL-1β，IL-6，TNF-α mRNAは1時間以内に発現が増強した．IL-2，IFN-γ mRNAはOK-432では3時間後より誘導されたが，PSKでは24時間まで誘導されなかった．サイトカイン蛋白はmRNA誘導より1～3時間のタイムラグをもって産生された．次にBRMに対する感受性の個体差を検討するため，臨床症例にOK-432を投与し，末梢血単核球におけるサイトカインmRNAの発現を解析した．皮内投与では多種のサイトカカインmRNAが強く誘導される症例（high responder）が34例中4例あり，このような症例がBMR療法奏効例になるものと推察された．

Key words： cytokine mRNA，OK-432，PSK，responder to BRM，RT-PCR

はじめに

OK-432とpolysaccharide K（PSK）は広く臨床で用いられているbiological response modifiers（BRM）であるが，これらは種々の作用により抗腫瘍活性を発揮する．なかでもサイトカイン誘導能は重要と考えられ，これらのBRMがどのようなサイトカインをどのような順序で誘導していくかは興味あるところである．そこでOK-432とPSKのin vitroにおけるIL-1β，IL-2，IL-6，TNF-α，IFN-γの誘導を，reverse transcription-polymerase chain reaction（RT-PCR）を用いてmRNAレベルで経時的に解析し，イムノアッセイによる蛋白レベルでの結果と比較検討した．

これらのBRMの臨床応用では，当初期待されていたほどの臨床成績が得られていないのが現状である[1]．しかし一方では，BRMの投与により腫瘍の著明な縮小や消失[2)~4)]，QOLの改善[5)6)]，さらには予後の延長[7)~10)]をみる症例が少数ながらあることも事実である．この理由の1つとして，BRMに対する感受性に個体差があることが考えられる．そこで臨床症例にOK-432を投与し，末梢血単核球（peripheral blood mononuclear cells：以下，PBMCと略記）におけるサイトカインmRNA誘導の個体差を検討した．

＜1996年5月8日受理＞別刷請求先：上平　裕樹
〒700　岡山市鹿田町2－5－1　岡山大学医学部第1外科

対象と方法

1．in vitroでのBRMによるサイトカイン誘導の経時的解析

1）対象

5人の健常人のPBMCを対象とした．

2）PBMC分離とBRM添加培養

健常人末梢血よりFicoll-Conray溶液による比重遠心法にてPBMCを分離した．このPBMCを血清無添加RPMI-1640液で10^6個/mlの濃度に調整し，これにOK-432（中外製薬）を0.005，0.05KE/mlあるいはPSK（三共製薬）を0.01，0.05mg/mlの各濃度に添加して37°C，5％CO_2下に培養した．なおOK-432 0.05KE/mlは3例で，OK-432 0.005KE/mlおよびPSK 0.01mg/ml，0.05mg/mlは各1例で培養を行った．

3）全RNAの抽出と電気泳動

培養前および培養後1，3，6，12，24時間の各PBMCよりそれぞれISOGEN（ニッポンジーン）を用いたAGPC法[11)]により全RNAを抽出した．各PBMC 10^7個に対し1mlのISOGENを用い，得られたRNAの沈澱を水に溶解して吸光度計により濃度を調整した．この各RNAをアガロースゲルで電気泳動して18Sと28Sのバンドを確認した．

4）RT-PCR

Table 1 Oligonucleotide primers used for RT-PCR and internal probes used for Southern blot hybridization

Cytokine	Primer	Sequence(5′→3′)	Size of PCR product(bp)
IL-1[13]	5′	ACCTCCAGGGACAGGATATG	160
	3′	TCCAGCTGTAGAGTGGGCTT	
	Internal probe	CAAGGCCACAGGTATTTTGT	
IL-2[14]	5′	ACTGGAGCATTTACTGCTGG	222
	3′	CTGATTAAGTCCCTGGGTCT	
	Internal probe	GGCCTTCTTGGGCATGTAAA	
IL-6[15]	5′	TCGGTACATCCTCGACGGCA	144
	3′	CCAGATTGGAAGCATCCATC	
	Internal probe	CTGCCAGTGCCTCTTTGCTG	
TNF-α[16]	5′	GTGACAAGCCTGTAGCCCAT	259
	3′	GAGAGGAGGTTGACCTTGGT	
	Internal probe	CTGGTTATCTCTCAGCTCCA	
IFN-γ[17]	5′	GGTCATTCAGATGTAGCGGA	166
	3′	TGGTCTCCACACTCTTTTGG	
	Internal probe	GACAATTTGGCTCTGCATTA	

各RNAをランダムヘキサヌクレオチド(宝酒造), M-MLVリバーストランスクリプターゼ(GIBCO BRL社)とともに37°C, 60分反応させ, cDNAを作成した. 続いてPCRにより, IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α, IFN-γの5種のサイトカインと内部コントロールとしたβ-actinの各遺伝子を増幅した. PCR反応はcDNAにプライマー, TaqDNAポリメラーゼ(Promega社)を加え, Thermal Cycler (PERKIN ELMER CETUS社)を用い, denaturation 94°C, 30秒, annealing 55°C, 1分, extension 72°C, 2分の条件で行った[12]. PCRサイクル数設定のために各サイトカインごとに数種類のサイクル数でPCRを行って, プラトーに達しない最適のサイクル数を決定した.

5) オリゴヌクレオチドプライマーとインターナルプローブ

PCRの増幅領域が少なくとも1つ以上のイントロンをまたぐようにプライマーを設定し, DNAシンセサイザー(Model 380B, Applied Biosystems社)を用いて20merの一対のオリゴヌクレオチドを合成した. また, PCR増幅領域内にハイブリダイズさせるプローブとして20merのオリゴヌクレオチドを同様に合成した(**Table 1**).

6) 増幅遺伝子の検出

PCR反応液をポリアクリルアミドゲルで電気泳動後, エチジウムブロマイド染色し, 紫外線トランスイルミネーター上で写真撮影した. サイズマーカーにはϕX174/Hae III digest (TOYOBO社)を用い, 目的とする増幅遺伝子のバンドは増幅遺伝子の大きさにより判定した.

7) サザンブロット

OK-432 0.05KE/mlの症例のPCR産物について行った. PCR反応液をアガロースゲルで電気泳動後, ゲルを変性液, 中和液で処理した. 続いでゲル中のDNAをナイロンフィルター(HybondN+, Amersham社)へトランスファーした後, フィルターをrapid hybridization buffer (Amersham社)にてプレハイブリダイズした. **Table 1**に示した合成オリゴヌクレオチドインターナルプローブをT4ポリヌクレオチドキナーゼ(TOYOBO社), 〔γ-^{32}P〕dATP (7,000 Ci/mmol, ICN社)とともにインキュベートして^{32}Pで標識した後, ハイブリダイズした[18]. ハイブリダイズ後のフィルターはイメージングプレート(フジフィルム)を用いてオートラジオグラフィーを行い, バイオイメージアナライザー(BAS2000, フジフィルム)にてバンドのradioactivityを測定し, 経時的変化を定量的に解析した.

8) 培養上澄中のサイトカイン蛋白量の測定

各培養上澄中のIL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α, IFN-γ蛋白量を測定した. 大塚アッセイにより, IFN-γはIRMA法, 他はELISA法[19]で測定した.

2. OK-432投与症例の末梢血単核球におけるサイトカインmRNA誘導の検討

1) 対象

悪性疾患42例, 良性疾患1例, 健常人4例を対象とした. 悪性疾患は胃癌33例, 肺癌4例, 膵癌2例, 食道癌2例, 肝細胞癌1例であった. 年齢は悪性疾患では44歳から82歳で平均63.0歳, 良性疾患および健常人では33歳から67歳で平均42.2歳, 全体の平均は60.8歳

Table 2 Characteristics of patients and healthy volunteers with OK-432 injection

Disease	No. of cases(i.d.*cases)
Malignant disease	42(29)
Gastric cancer	33(25)
Lung cancer	4(2)
Pancreatic cancer	2(0)
Esophageal cancer	2(1)
Hepatocellular carcinoma	1(1)
Benign lung tumor	1(1)
Healthy volunteer	4(4)
Total	47(34)

Age(mean)：33～82(60.8)

Malignant disease 44～82(63.0)
Benign disease and Healthy volunteer 33～67(42.2)

Male : Female＝38 : 9
*i.d : intradermal injection

であった．性別は男性38例，女性9例であった(**Table 2**)．

2) 方法

OK-432 2KE を上腕の筋肉内あるいは皮内に投与した．悪性および良性疾患症例では，術前未治療時に投与した．筋肉内，皮内とも投与前と投与後12時間あるいは24時間に採血し，PBMC を分離した．投与後の採血を12時間後にするか24時間後にするかは症例をランダムに選択した．前記と同様に全 RNA を抽出し，RT-PCR を行って OK-432投与前後のサイトカイン mRNA の発現を検討した．IL-1β，IL-6，TNF-α，IFN-γ の4種のサイトカインについて検討した．内部コントロールには glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた．PCR サイクル数は GAPDH が23サイクル，IL-6が28サイクル，他はすべて25サイクルとし，それ以外の PCR 条件は前記と同じとした．皮内投与で IL-1β と TNF-α の両方とも誘導のみられた8例について PCR 産物のサザンブロットを行い，定量的に解析した．

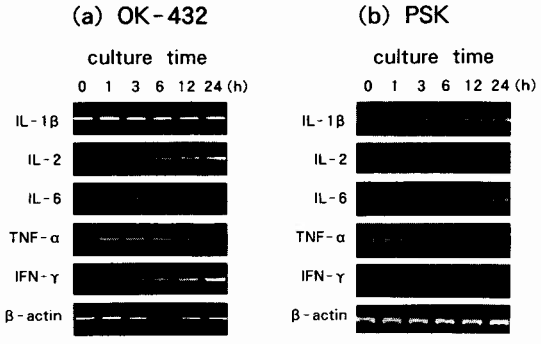
結　果

1. in vitro での BRM によるサイトカイン誘導の経時的解析

1) RT-PCR

PCR 反応がプラトーに達しない最適の PCR サイクル数は，IL-2が45サイクル，IL-6が25サイクル，他が22サイクルであった．RT-PCR 産物を電気泳動後，エチジウムブロマイド染色した結果，内部コントロールの

Fig. 1 Time course of mRNA expression for IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α and IFN-γ in PBMC stimulated by OK-432 (0.05KE/ml) or PSK (0.05 mg/ml).

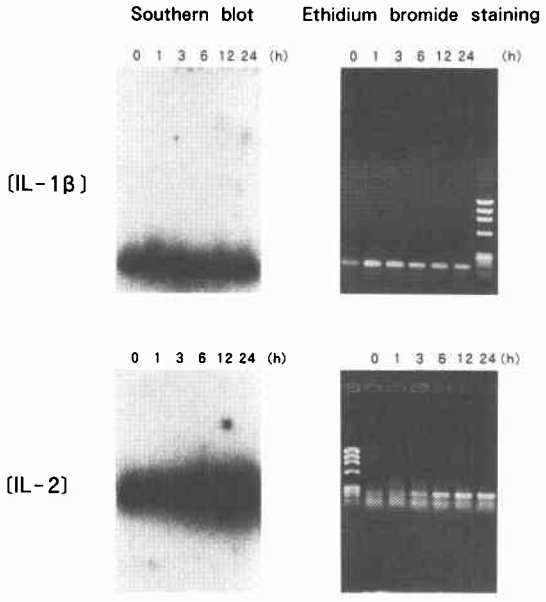


β-actin のバンドはほぼ均一であり，RT-PCR に用いた RNA 量がほぼ等しいことを示した．IL-1β，IL-6，TNF-α 各 mRNA は OK-432, PSK とも培養後速やかに発現が増強した．IL-2 mRNA は他のサイトカインと比べて発現量が少なく，OK-432では PCR を45サイクル行うことにより培養3時間後より発現の増強が検出されたが，PSK では検出されなかった．IFN-γ mRNA は OK-432では培養3時間後より発現が増強したが，PSK では24時間まで全く増強しなかった(**Fig. 1**)．OK-432 0.05KE/ml では3例とも同様の結果を示したが，OK-432 0.005KE/ml では0.05KE/ml の場合と比べ，IL-2と IFN-γ mRNA の誘導が遅れ，培養6時間後よりみられた．また PSK については 0.01mg/ml の場合は0.05mg/ml の場合よりサイトカイン誘導の程度が弱いものの，経時的な誘導パターンは同様であった．

2) サザンブロット

エチジウムブロマイド染色でのバンドに特異的にプローブがハイブリダイズし，このバンドが目的とするサイトカイン遺伝子に由来することが証明された(**Fig. 2**)．IL-6，TNF-α，IFN-γ でも同様であった．このバンドの定量的解析では，IL-1β, IL-6, TNF-α はいずれも培養後1時間で急速に発現が増強し，3時間でピークとなり，以後減衰した．ピーク時の radioactivity 値を培養前と比較すると，この症例では IL-1β は3.2倍，IL-6は12.4倍，TNF-α は4.8倍に増強していた．IL-2と IFN-γ は培養後3時間で急速に発現が増強し，以後24時間まで増強し続けた．培養前と24時間後を比較すると，IL-2は4.9倍，IFN-γ は14.7倍に増強

Fig. 2 Southern blot hybridization of the IL-1β and IL-2 PCR products shown in Fig. 1 (a).



していた（**Fig. 3**）.

3）培養上澄中のサイトカイン蛋白量

OK-432添加培養では IL-1β, IL-6, TNF-α はいずれも培養3時間後より著明な上昇を認め，IFN-γ は6時間後より上昇を認めた．PSK 添加培養では IL-1β, IL-6, TNF-α はいずれも OK-432同様3時間後より上昇を認めたが，いずれも OK-432に比べ低値であった．IFN-γ は PSK では24時間まですべて低値であった．IL-2は OK-432, PSK ともすべて測定限度以下であった（**Table 3**）.

2．OK-432投与症例の末梢血単核球におけるサイトカイン mRNA 誘導の検討

1）筋肉内投与例

投与12時間後をみた9例では6例に IL-1β の誘導を認め，3例に TNF-α の誘導を認めたが，IFN-γ が誘導された症例は1例のみであった．一方，投与24時間後をみた4例のうち2例に IFN-γ の誘導を認めた（**Fig. 4**）.

2）皮内投与例

全くサイトカインの誘導を認めない症例を non-responder，それ以外を responder としたところ，皮内投与34例のうち14例が responder，20例が non-responder であった．この14例の responder の中で IL-1β, IL-6, TNF-α の3つのサイトカインを他症例と比べ強く誘導している症例を4例認めた．そこでこの4例を high responder，他の10例を low responder とした（**Fig. 5**）．high responder とした4例と，low responder のうち IL-1β と TNF-α の2つとも誘導がみ

Fig. 3 Quantitative analysis of the PCR products shown in Fig. 1 (a) by Southern blot hybridization. Numerical values of the vertical line stand for relative radioactivity.

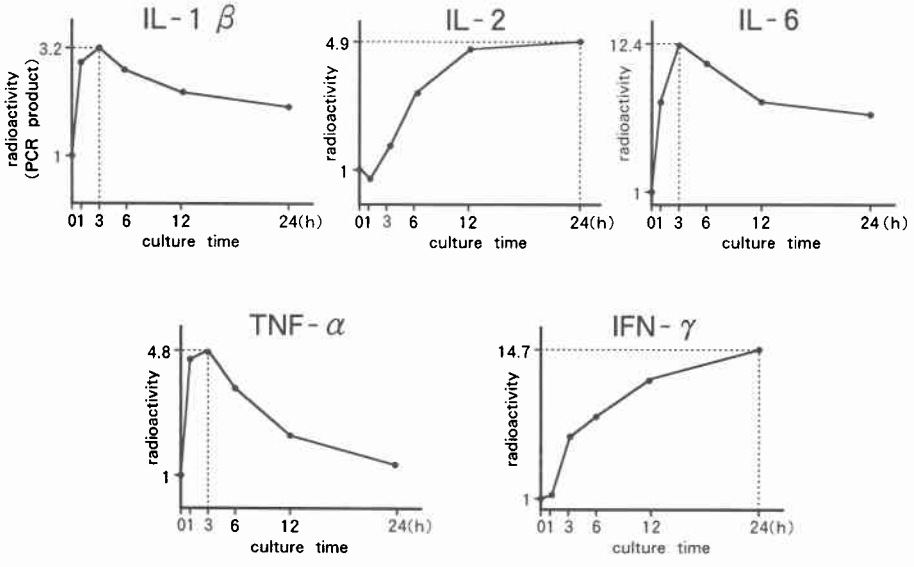


Table 3 The amount of cytokine protein, IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α and IFN-γ, in the culture supernatants from OK-432 or PSK-stimulated PBMC, the same case as Fig.1

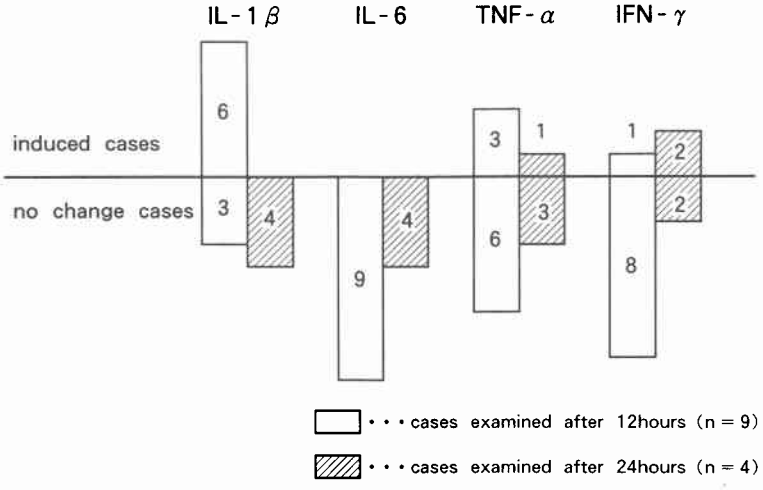
(a) OK-432

culture time	0	1	3	6	12	24	(h)
IL-1β	<10	<10	860	11,000	7,490	8,410	(pg/ml)
IL-2	<50	<50	<50	<50	<50	<50	(pg/ml)
IL-6	35	33	353	1,430	3,850	5,430	(pg/ml)
TNF-α	<5	76	2,250	8,890	15,000	19,400	(pg/ml)
IFN-γ	1	1.1	1.1	4.5	130	970	(U/ml)

(b) PSK

culture time	0	1	3	6	12	24	(h)
IL-1β	<10	<10	41	45	134	337	(pg/ml)
IL-2	<50	<50	<50	<50	<50	<50	(pg/ml)
IL-6	<25	<25	112	396	726	3,840	(pg/ml)
TNF-α	<5	17	55	56	51	54	(pg/ml)
IFN-γ	1.4	0.7	0.4	0.6	0.4	0.9	(U/ml)

Fig. 4 Change of the mRNA expression for IL-1β, IL-6, TNF-α and IFN-γ in PBMC from patients with OK-432 intramuscular injection.



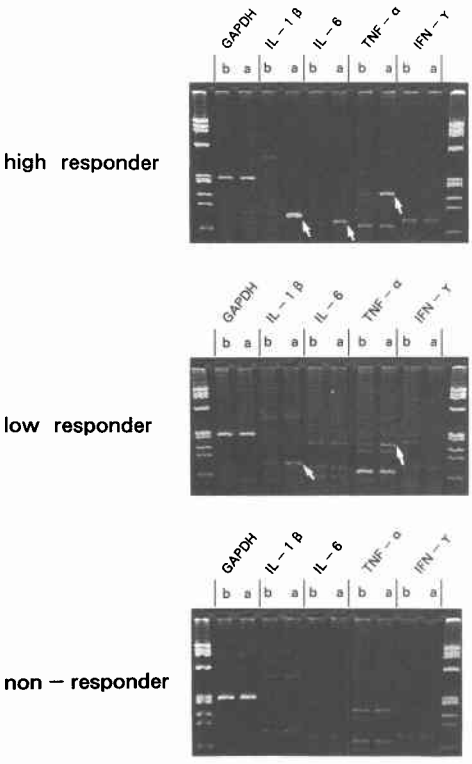
られた4例の合計8例について RT-PCR 産物のサザンブロットを行って，OK-432投与前後の IL-1β と TNF-α mRNA 発現の変化をみた．投与後の radioactivity 値を投与前と比較すると，high responder 4例の平均では，IL-1β が5.7倍，TNF-α が3.9倍に増強しているのに対し，low responder 4例の平均は IL-1β が2.2倍，TNF-α が1.9倍であり，high responder はいずれも low responder より明らかに強くサイトカインが誘導されていた（**Fig. 6**）．

悪性疾患29例では，4例が high responder，7例が low responder，18例が non-responder であり，悪性疾患と健常人の間に response の有意差はなかった（**Table 4**）．また胃癌症例で進行度[20]別に response の差を見たところ，high responder は Stage I 症例のみであったが，統計学的には進行度による有意差は認めなかった（**Table 5**）．平均年齢も high responder が63.0±10.2歳，low responder が65.4±12.5歳，non-responder が63.4±11.2歳で差がなかった．

考　察

BRM によるサイトカイン誘導機序を解明するた

Fig. 5 Cases of high responder, low responder and non-responder determined by cytokine mRNA induction pattern in patients with OK-432 intradermal injection.



b : before injection
a : after injection
arrow : induced cytokine mRNA after injection

め，in vitroにおける各種サイトカイン誘導をRT-PCRおよびイムノアッセイを用いてmRNAレベルと蛋白レベルの両面から経時的に解析した．

1. OK-432のサイトカインmRNA誘導能

OK-432はこれまでにIL-1[21]，IL-2[21]，IL-6[22]，TNF-α[23]，IFN-γ[24]，CSF[25]など多くのサイトカインの誘導が確認され，まさにマルチサイトカインインデューサーであるが，今回の著者らの検討でも検索したすべてのサイトカインmRNAの誘導が確認された[26]．蛋白レベルではIL-2のみ検出できなかったが，これはIL-2 mRNAがPCRを45サイクル行ってようやく検出されたことを考えると，イムノアッセイの測定限界以下の微量な産生であり，RT-PCR法の測定感度の高さが示された．

本研究で，OK-432によりin vitroで誘導されるサイトカインには，1時間以内にmRNAの発現が増強するIL-1β，IL-6，TNF-αと，遅れて増強するIL-2やIFN-γの2群があった．ここでIL-2とIFN-γの産生細胞はT細胞系に限られるのに対し，IL-1β，IL-6，TNF-αはいずれも単球あるいはマクロファージが主な産生細胞であることを考えると，OK-432によりまず単球が刺激されてIL-1β，IL-6，TNF-αなどが産生され，続いてこれらのサイトカインがT細胞を刺激してIL-2やIFN-γが産生されるというカスケード[27]に合致していた．

石田ら[28]はOK-432がin vivoで効果的に作用する場合，まず好中球，次いでマクロファージ，さらにhelper T細胞，killer T細胞という順序でエフェクター細胞がsequentialにテンポ良く出現し，サイトカインに関してはマクロファージまでの段階ではIL-1β，IL-6，TNF-αが関与し，T細胞の段階ではIL-2やIFN-γが関与するとしており，このような「sequence と tempo」に従ったエフェクター細胞とサイトカインの流れが必要であると述べている．著者らのin vitroの実験系では好中球は除いてあり，OK-432は単球を直接刺激してサイトカインを産生させたと考えられる．データは示していないが，さらに単球を除去した系でもサイトカインの誘導はみられた．このようにOK-432の場合，in vitroではsequentialなエフェクター細胞の出現がなくてもサイトカカインの誘導は起こるものと考えられる．癌性胸膜炎や癌性腹膜炎に対するOK-432の胸腔内，腹腔内投与に著効例が多い[3)4)]のは胸腔，腹腔という閉鎖腔がin vitroの培養系に近い状態になり，サイトカインの産生が起きやすく，またサイトカインを高濃度に保ちやすいためと考えられる．

2. PSKのサイトカインmRNA誘導能

PSKではIL-1β，IL-6，TNF-α mRNAはOK-432同様速やかな誘導が確認されたが，TNF-α mRNAの誘導は軽微であった．IL-2とIFN-γ mRNAは少なくとも24時間まで誘導が確認されなかった．Hiroseら[29]はPBMCをPSK添加培養し，ノーザンブロットにてIL-1α，IL-1β，IL-6，IL-8，TNF-α mRNAの誘導を1時間以内に認めているが，IL-2とlymphotoxin mRNAの発現は少なくとも72時間まで認めず，著者らの結果と同様であった．したがって，PSKは単球を活性化するがTリンパ球は活性化しないとしている．上田ら[30]はIL-2は36時間後の培養上澄に弱く認められたと報告し，阿部ら[31]はIFN-γは2日目の培養上澄ではじめて検出されたと報告している．これらのこと

Fig. 6 Southern blot hybridization and quantitative analysis of the IL-1β and TNF-α PCR products in 4 cases of high responders and 4 cases of low responder.

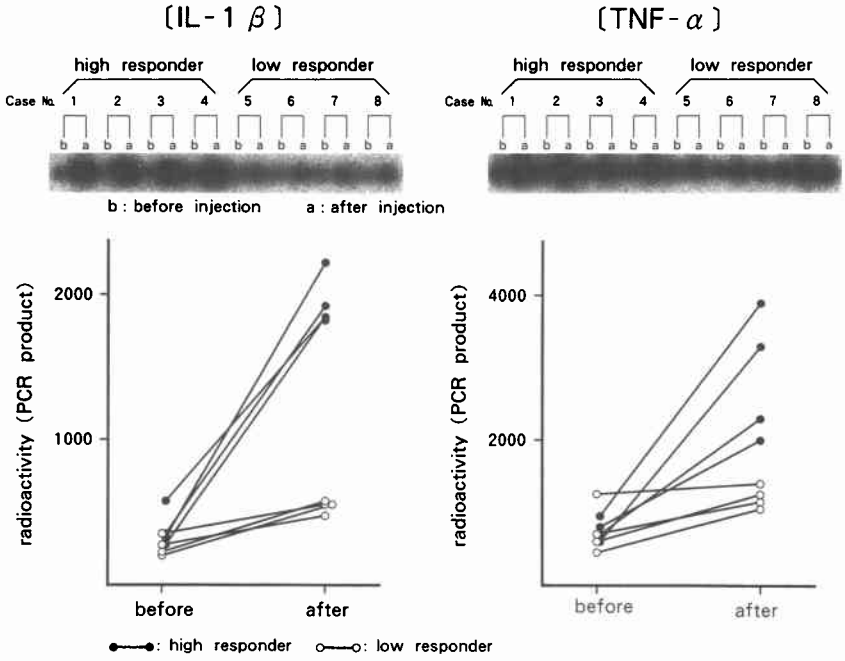


Table 4 Case number of high responder, low responder and non-responder in patients and healthy volunteers with OK-432 intradermal injection

		high responder	low responder	non-responder
Malignant disease	after 12hours (n=23)	2	7	14
	after 24hours (n=6)	2		4
Benign disease	(n=1)		1	
Healthy volunteer	(n=4)		2	2
Total	(n=34)	4	10	20

N.S. : not significant

Table 5 Case number of high responer, low responder and non-responder in patients with gastric cancer

	high responder	low responder	non-responder
Stage I	3	5	9
Stage II			1
Stage III		1	4
Stage IV		1	1

N.S. : not significant

より，IL-2と IFN-γ は誘導されにくいものと考えられるが，本研究での PSK は 2 例しか行っておらず，low responder の PBMC であった可能性があり，また PSK 濃度や培養時間の問題もあるため断定はできない．

3．サイトカイン mRNA 発現とサイトカイン蛋白産生の関係

mRNA 発現と培養上澄中の蛋白量の経時的関係をみると，IL-1β，IL-6，TNF-α など 1 時間後にすでに mRNA 発現が増強していたものでは，蛋白は 3 時間後より上昇した．また IFN-γ は OK-432添加培養 3 時間後より mRNA 発現が増強していたが，蛋白は 6 時間後より上昇した．これらのことより，mRNA 発現か

ら1～3時間のタイムラグをもって蛋白が産生されるものと考えられた．また蛋白がすべて測定限界以下であったIL-2を除いては，RT-PCRの結果とイムノアッセイの結果とはタイムラグを考慮すればすべて一致しており，血清の影響のないin vitroの系ではmRNA発現と蛋白産生はパラレルであった．

4．RT-PCRによるmRNA定量法

RT-PCRによるmRNA定量法については諸家の報告[32)~34)]がある．絶対的定量が可能という点で注目されるのはWangら[32)]やGillilandら[33)]が行ったcompetitive PCR法であるが，この方法はインターナルスタンダードの作製が必要であり手技がやや煩雑である．データは示していないが，著者らは，RTに用いるRNAの濃度と内部コントロールであるβ-actin，GAPDHのRT-PCR結果を比較し，これら3者の結果がパラレルであること，すなわち内部コントロールがRNA濃度を反映していることを確認した上で，内部コントロールのバンドが均一であるものについて，目的サイトカインのバンドの濃度を比較した．この方法では，目的サイトカインのmRNAの発現が多量でPCR反応がプラトーになると定量性が失われるという欠点があるが，簡便に相対的定量が行える．目的バンドの濃度の測定にはデンシトメーターを用いる方法が簡便であるが，エチジウムブロマイド染色の発光に余り定量性がないので，正確な定量にはRI標識プライマーによるPCRやサザンブロット法などにより，ゲル上の特定バンドの測定が必要である．今回のRT-PCR産物のサザンブロットによる定量では，in vitroの経時的解析におけるサイトカインのPCR反応がプラトーあるいはプラトーに近い状態と考えられるため，ピーク時にはもっと多量のmRNAが発現しているものと推測される．臨床症例のhigh responderについても同様である．

5．OK-432投与症例におけるサイトカインmRNA誘導

in vivoではBRM投与により誘導されるサイトカインを検出することは従来困難であり，BRMの効果をNK活性，リンパ球サブセットなどをもとに判断することが多かった[35)~38)]が，RT-PCR法により微量のサイトカインmRNAを測定できるようになり[39)]，新たや重要なパラメーターが加わった．臨床例に通常用いる程度の量のBRMを筋肉内，皮内あるいは経口で投与し，末梢血におけるサイトカインの誘導をとらえることはBRMによるその個体の全身的な免疫賦活状態をみていると言え，BRM療法の効果判定法として現実的である．佐治ら[40)]は担癌患者にPSK 1gを単回経口投与し，PBMCにおけるIL-6 mRNAの誘導をみている．また星野ら[41)]は担癌患者にOK-432 5KEを皮下投与し，IL-1β，IL-6，M-CSF mRNAの誘導をみている．著者らは臨床症例にOK-432 2KEを筋肉内あるいは皮内に投与し，各種サイトカインmRNAの誘導をみた．

筋肉内投与は症例数は少ないが，投与12時間後をみるとIL-1β，TNF-αの誘導される症例が多く，24時間後をみるとIFN-γの誘導される症例が多かった．これはある程度in vitroの結果を反映しており，その理由として，筋肉内投与では皮内投与に比べ，OK-432の周囲への拡散が比較的速やかであるため末梢血へその効果が出やすく，単球からT細胞というカスケードが起きやすいことが上げられる．このことは皮内投与ではOK-432投与後の発熱があまりみられないのに対し，筋肉内投与では投与後数時間でほとんどの症例に一過性の発熱をみることとも関係していると思われる．発熱のある投与4～5時間後をみれば，サイトカインmRNAの発現は12時間後や24時間後より強かった可能性がある．

一方，皮内投与で注目すべきは，多種のサイトカインが強く誘導される症例（high responder）の存在である．その誘導の強さはIL-1βとTNF-αでみると，それぞれ投与前の5.7倍，3.9倍（平均）であり，low respoderの2.2倍，1.9倍に対し明らかに高値であった．high responder 4例のうち2例は24時間後をみたもので，24時間後でもなおIL-1β，IL-6，TNF-αmRNAの強い発現が維持されていた．このことは，皮内投与ではOK-432の拡散が遅く筋肉内投与のような急速な反応はみないが，長く局所で抗原性を維持し，マクロファージなどの抗原提示細胞にとらえられ細胞性免疫を賦活する[42)]ためと思われる．残念ながら24時間以降はみておらず，IFN-γの誘導，言い換えればT細胞の活性化まで至ったかどうか確認できてないが，このような症例が実際の臨床でのresponder，すなわちBRM療法が有効な症例ではないかと予想される．しかし，サイトカインが強く長期に誘導される症例がBRM療法が奏効するという証拠はなく，この結論を出すには多くのBRM療法施行患者でサイトカイン誘導と治療効果とを詳細に検討することが心要であろう．

年齢や癌の病期は宿主の免疫能にとって重要な因子

であろうが，本研究ではOK-432に対するresponseと年齢，胃癌の進行度および悪性疾患の有無とは相関がなかった．これには症例数が少ないことが理由として考えられるが，BRMに対するresponseについては個体差も1つの重要な因子と考えられた．

6．BRM療法の今後

BRM療法は宿主のもつ免疫能を修飾することにより抗腫瘍効果を期待する治療法で，この宿主介在性という点で，手術，放射線，化学療法などの他の治療法とは性格を異にしている．したがってBRM療法を行う場合，BRMに対するresponseの個体差や宿主の免疫抑制状態など宿主要因を考慮しなければならないことは当然である．また宿主要因だけではなく，腫瘍側要因も考える必要がある．多くの腫瘍が種々のサイトカインを産生する事が判っており[43]，腫瘍の産生するサイトカインにより悪液質がもたらされる[44][45]こともよく知られている．サイトカインを産生する腫瘍にBRMがおよぼす影響は複雑であると想像され，個々の腫瘍ごとにBRMの適応を考える必要があろう．しかしながら，現在BRMの保険適応は，例えばPSKなら胃癌，大腸癌，肺小細胞癌といったように主に臓器によって規定されている．これは非合理的であり，宿主および腫瘍側要因を考慮した適応にすべきであろうが，その判定法の確立こそ今後BRMが癌治療において重要な地位を占めていくための鍵になると思われる．RT-PCRを用いたPBMCにおけるサイトカインmRNA検出法は，宿主要因を判定する有用な方法で，BRMに対するresponder, non-responderの選別のみならず，BRM療法施行患者の免疫賦活状態のmonitoring，さらにはそれを通じて患者個々の投与量，投与間隔などの至適投与法決定にも役立つものと思われた．

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜りました折田薫三教授ならびに田中紀章教授に深甚なる謝意を表します．また，直接御指導，御教示頂いた岡林孝弘博士に深く感謝申し上げます．

なお，本論文の要旨は第94回日本外科学会総会（東京）ならびに第32回日本癌治療学会総会（岡山）において発表した．

文　献

1) 藤本修一，新田和男：免疫療法でなぜCR，PRがとれないか？　癌と化療　17：459—463，1990
2) 岡　正郎，谷　彰一，内山哲史ほか：各種BRM併用（Combination Immunotherapy）によりCRとなった術後早期再発肝細胞癌の1症例．日癌治療会誌　26：1425—1428，1991
3) 加藤一哉，草野満夫，小野寺一彦ほか：ポータカットによるOK-432の胸腔内投与が有効であった癌性胸膜炎の1症例．診療と新薬　26：171—174，1989
4) 武越　裕，吉田憲一，森永正二郎：Immunochemotherapyで寛解した癌性胸・腹膜炎の2症例．癌と化療　19：1466—1469，1992
5) 星野　孝：BRMとQOL．Ther Res　11：2609—2622，1990
6) 飴島慎吾：OK-432のQOL改善作用と神経内分泌系に対する作用．Ther Res　14：4816—4822，1993
7) 坂部　孝，藤井雅志，高松和郎ほか：進行胃癌に対するOK-432の効果—Randomized Controlled studyによる再検討—．医と薬学　18：1907—1912，1987
8) Watanabe Y, Iwa T: Clinical values of immunotherapy with the streptococcal preparation OK-432 in non-small cell lung cancer. J Biol Resp Modif 6：169—180，1987
9) 江端俊彰，戸塚守夫，内野純一ほか：進行胃癌に対するレンチナンの臨床効果．Biother　5：721—733，1991
10) 山田昌弘，塚本東明：腫瘍切除と化学療法で9年間生存中のD2肺腺癌の1例．肺癌　33：1071—1075，1993
11) Chomczinski K, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162：156—159，1987
12) Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC et al: Illegitimate transcription: Transcription of any gene in any cell type. Proc Natl Acad Sci USA 86：2617—2621，1989
13) Clark BD, Collins KL, Gandy MS et al: Genomic sequence for human prointerleukin 1 beta: possible evolution from a reverse transcribed prointerleukin 1 alpha gene. Nucl Acids Res 14：7897—7914，1986
14) Fujita T, Takaoka C, Matsui H et al: Structure of the human interleukin 2 gene. Proc Natl Acad Sci USA 80：7437—7441，1983
15) Yasukawa K, Hirano T, Watanabe Y et al: Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. EMBO J 6：2939—2945，1987
16) Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY et al: Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. Nucleic Acids Res 13：6361—6373，1985

17) Patrick WG, David VG: Structure of the human immune interferon gene. Nature **298**: 859—863, 1982
18) Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol **98**: 503—517, 1975
19) Tanaka K, Ishikawa E, Ohtomo Y et al: Sandwich enzyme immunoassay for human interleukin-1β in urine. Clin Chim Acta **166**: 237—246, 1987
20) 胃癌研究会編：胃癌取扱い規約．改訂第12版．金原出版，東京，1993，p16—17
21) Ichimura O, Suzuki S, Saito M et al: Augmentation of interleukin 1 and interleukin 2 production by OK-432. Int J Immunopharmacol **7**: 263—270, 1985
22) Fukui H, Koishihara Y, Nagamuta M et al: Production of IL-6 by human spleen cells stimulated with Streptococcal preparation OK-432. Immunol Lett **21**: 127—130, 1989
23) Fujii M, Abo T, Kumagai K: Cytokines produced by blood mononuclear cells stimulated with the streptococcal preparation OK-432: effect on production by supplementing the medium with xenogeneic serum. Cancer Immunol Immunother **27**: 97—102, 1988
24) Noda T, Asano M, Yoshie O et al: IFN-γ induction in human peripheral blood mononuclear cells by OK-432, a killed preparation of Streptococcus pyogenes. Microbiol Immunol **30**: 81—88, 1986
25) Hiraoka A, Yamaguchi M, Ohkubo T et al: Effect of a streptococcal preparation, OK-432, on murine hematopoietic stem cells. Cancer Res **41**: 2954—2958, 1981
26) 上平裕樹，岡林孝弘，中谷　紳ほか：RT-PCR法を用いたOK-432によるサイトカインmRNA誘導の経時的解析．医のあゆみ　**163**：701—702, 1992
27) 市村　修，鈴木清吉，斉藤元男ほか：OK-432によるマウスinterleukin 1およびinterleukin 2の産生増強作用．医のあゆみ　**127**：296—298, 1983
28) 石田名香雄，斉藤元男：OK-432の作用機序をわれわれはいかに解明してきたか？ Biother　**4**：155—165, 1990
29) Hirose K, Zachariae COC, Oppenheim JJ et al: Induction of gene expression and production of immunomodulating cytokines by PSK in human peripheral blood mononuclear cells. Lymphokine Res **9**: 475—483, 1990
30) 上田祐二，山岸久一，内藤和世ほか：OK-432, PSKのIn vitroにおけるヒト末梢血Tリンパ球活性化機序の検討．Biother　**4**：712—716, 1990
31) 阿部康人，三宅正純，堀内　淳ほか：クレスチン(PSK)によるサイトカインの誘導．医のあゆみ **152**：617—618, 1990
32) Wang AM, Doyle MV, Mark DF: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA **86**: 9717—9721, 1989
33) Gilliland G, Perrin S, Blanchard K et al: Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA **87**: 2725—2729, 1990
34) Makino R, Sekiya T, Hayashi K: Evaluation of quantitative detection of mRNA by the reverse transcription-polymerase chain reaction. Technique **2**: 295—301, 1990
35) 福島松郎，合地　明，鯉江久昭ほか：Adjuvant Immuno-chemotherapyにおける宿主要因に関する検討．日外会誌　**92**：1241—1245, 1991
36) 小尾芳郎：Biological Response Modifier (BRM)の胃癌病巣周囲への局在注射による所属リンパ節内リンパ球の免疫能の変動．日外会誌　**92**：293—302, 1991
37) 緒方　裕，磯本浩晴，白水和雄ほか：直腸癌に対するOK-432の腫瘍近傍投与によるNK活性増強効果．日消外会誌　**24**：2990—2995, 1991
38) Gotoh K, Gouchi A, Akura Y et al: Augmentation of cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes by biological response modifiers. Int J Immunopharmacol　**13**: 485—492, 1991
39) 中尾光善：Polymerase chain reactionを用いた新しい方法による末梢血液中の単核細胞のサイトカインmRNAの解析．久留米医会誌　**54**：106—114, 1991
40) 佐治重豊，梅本敬夫，杉山保幸ほか：宿主要因からみたPSKの適応と作用機序解明に関する検討．Biother　**5**：1996—2004, 1991
41) 星野泰三，鈴木泰伸，足立　匡ほか：担癌患者へのOK-432投与による末梢血単核球分画細胞のサイトカインmRNA誘導．医と薬学　**29**：851—852, 1993
42) 星野　孝：筋注から皮内注へ．Ther Res **9**: 635—644, 1988
43) Pekarek LA, Weichselbaum RR, Beckett MA et al: Footprinting of individual tumors and their variants by constitutive cytokine expression patterns. Cancer Res **53**: 1978—1981, 1993
44) Oliff A, Defos-Jones D, Boyer M et al: Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. Cell **50**: 555—563, 1987
45) Strassmann G, Fong M, Kenney JS et al:

Evidence for involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. J Clin Invest 89：1681—1684, 1992

Analysis of Cytokine mRNA Induction by Biological Response Modifiers Using the RT-PCR Method

Hiroki Johira
First Department of Surgery, Okayama University Medical School

In order to elucidate the mechanism of cytokine induction by biological response modifiers (BRM), the expression of cytokine mRNA in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) cultured with OK-432 or polysaccharide K (PSK) was serially analyzed by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. IL-1 β, IL-6 and TNF-α mRNAs were induced within one hour after stimulation. IL-2 and IFN-γ mRNAs were induced three hours later in OK-432-stimulated PBMC, whereas they were not induced up to 24 hours later in PSK-stimulated PBMC. Production of cytokine proteins increased 1 to 3 hours after mRNA induction. It is important to consider various host factors when BRM therapy is employed. To investigate individual differences in response to BRM, cytokine mRNA induction in PBMC from OK-432-treated patients was analyzed. In 4 out of 34 intradermally injected patients, multiple cytokine mRNAs were strongly induced. We speculate that these patients may have shown good responses to BRM therapy.

Reprint requests: Hiroki Johira First Department of Surgery, Okayama University Medical School
2-5-1, Shikatacho, Okayama, 700 JAPAN