

癌性胸膜炎胸水中の好中球遊走因子に関する研究

— 溶連菌製剤 OK-432 による好中球遊走因子の誘導 —

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

森 下 亮 二

(平成 6 年 1 月 31 日受稿)

Key words : malignant pleural effusion, OK-432, neutrophil
chemotactic factor, C5a, IL-8

緒 言

悪性疾患にともなう癌性胸膜炎は日常しばしばみられ、その治療には主に局所療法がなされ、胸水の排除と薬剤の胸腔内投与が行われている。投与される薬剤には胸膜刺激剤、免疫賦活剤 (BRM: biological response modifiers)、抗癌剤などがある¹⁾。中でも BRM である OK-432 は癌性胸膜炎に対して最もよく用いられ、臨床的に有効であることがわかっている²⁾。OK-432 は全身的に投与された場合、種々の免疫担当細胞を賦活することにより抗腫瘍効果を発揮することが明らかにされており³⁾、胸水あるいは腹水中に投与された場合も好中球、リンパ球、マクロファージなどの細胞が出現することが報告されている⁴⁾。この様に癌性胸膜炎は薬剤投与に対する宿主の反応を観察することが可能であり、癌治療のモデル的側面を持っていると言える。そこで OK-432 が局所に投与された場合の宿主の反応の機序を解明するため、投与早期に胸水中に遊出してくる好中球の動態と好中球誘導に関与する因子について解析した。

対 象 と 方 法

1. 対 象

対象症例は21例の癌性胸膜炎患者で、その内訳は男性13例、女性8例で、年齢中央値は70歳であった。癌性胸膜炎の原因となった悪性腫瘍の組織型は肺癌19例、胃癌1例、乳癌1例で、全例細胞診にて癌性胸膜炎と診断されている。

2. 検体採取方法

OK-432は生理的食塩水に溶解して5KEを1回、胸腔内に注入した。注入前と、注入後6時間後、24時間後、48時間後の胸水を採取した。採取した胸水は細胞数を算定した後に遠沈し、細胞成分と液性成分に分離した。細胞成分は塗抹標本を作成し、May-Giemsa染色にて分類を行った。液性成分は-40℃で冷凍保存し、液性成分の解析に供した。

3. 好中球遊走活性の測定

正常人のヘパリン化静脈血にデキストランを加え、室温で30分静置した後、白血球を豊富に含む上清を Ficoll-Hypaque 液上に重層し400g×30分間遠沈し、試験管の底に沈下した赤血球と顆粒球の層を採取し、赤血球を蒸留水で溶血させた後、Hanks 液で2回洗浄した。次いでPRMI 1640中に好中球が $2 \times 10^6/\text{ml}$ となるよう調整浮遊した。

遊走活性の測定は Boyden 法により行った⁵⁾。即ち好中球浮遊液200 μl を blined well 型の chamber の上室に入れ、下室に胸水25 μl を充滿し、中間に孔径5 μm の millipore filter を置き、37℃、90分間反させた。反応後 filter を取り出しアルコール固定し Harris Hemtoxylin 液にて15分間染色、青化試薬で2分間反応、脱水後 HSR にて包埋した。走性の判定は顕微鏡下(オリンパスBH-RFC型)400倍にて filter 表面より50 μm の距離にある平面まで遊走してきた全視野中の細胞数を5視野数えて、その平均値を遊走活性 (cells/hpf) とし表した。

4. 胸水中 C5a の測定

補体分第5成分であるC5aはRIA法により、ヒト補体C5a (des Arg) ¹²⁵I assay system kit (Amersham社)を用いて測定した。前処置として胸水200 μ lと沈降試薬200 μ lを微量遠沈管に注入混和後、室温で5分間静置し、遠沈後上清を測定した。検体50 μ lとbuffer 50 μ lをポリチューブに注入し、tracer 50 μ lと抗C5a抗体を加え、室温で1時間静置した後、2次抗50 μ l加え15分間静置し、17.5%ポリエチレングリコール(PEG)を添加し沈澱形成後、遠心分離した。これを γ -カウンターにて測定した。C5a標準品を用いて検量線を作成し、検体濃度を算定した。

5. 胸水中IL-8, IL-1 β , IL-6の測定

Interleukin-8 (IL-8) は、enzym linked immunoassay (ELISA) による Quantikine Human IL-8 Immunoassay KIT (R&D社)を用いて測定した。抗IL-8モノクローナル抗体を固相化された microtiter plate に検体100 μ lと希釈用buffer100 μ lを入れ、室温で2時間反応後3回洗浄し、horseradish peroxidase 標識抗IL-8 ポリクローナル抗体200 μ lを加え、室温で2時間静置した後、3回洗浄した。さらに hydrogen peroxide, tetramethylbenzidine より成る発色液200 μ lを加え20分反応後、2N sulfuric acid を50 μ l加えて反応を停止させ、ELISA reader にて450nmで吸光度を計測した。IL-8 標準品を用いて検量線を作成し、検体のIL-8濃度を求めた。

Interleukin-1 β (IL-1 β) は IL-1 β Immunoassay KIT (Medogenix社)を用いて、2-step sandwich 法に基づく ELISA 法により測定した。Interleukin-6 (IL-6) も IL-1 β と同様の方法で、IL-6 Immunoassay KIT (Genzyme社)を用いて測定した。

6. 血清および胸水中 sIL-2R測定

可溶性 interleukin-2 receptor (sIL-2R) も、ELISA 法により CELLFREE INTERLEUKIN-2RECEPTOR TEST KIT (T-CELL SCIENCE社)を用いて測定した。

7. 結果の検定法

それぞれの実験結果は student' t test または

ノンパラメトリック法にて検定した。

結 果

1. OK-432 投与前後の胸水中細胞組成の推移

胸腔内に OK-432 を注入し、その前後で胸水中に遊走してきた細胞組成の変動をみた。好中球の比率をみると、投与前では $4.4 \pm 1.6\%$ であったものが、投与6時間後には $86.1 \pm 4.0\%$ と有意の増加が認められた ($p < 0.01$)。さらに24時間後には $63.8 \pm 7.9\%$ 、48時間後には $56.2 \pm 7.6\%$ と24時間以降は減少が認められたものの、投与前に比べると有意に増加していた ($p < 0.01$)。また単核球の比率は投与前は $93.6 \pm 1.5\%$ で、6時間後は $12.9 \pm 4.0\%$ 、24時間後は $34.7 \pm 8.1\%$ 、48時間後では $41.9 \pm 4.7\%$ と6時間後に有意の比率の低下が認められた ($p < 0.01$)。次にOK-432投与前後の胸水中の好中球数と単核球数を求めてみた。好中球数は投与前は、 260 ± 490 個/cmm、6時間後は 20600 ± 11500 個/cmm、24時間後では 8700 ± 6000 個/cmm、48時間後は 2600 ± 1200 個/cmmであった。好中球は投与後、比率のみならず絶対数も有意に増加していた ($p < 0.01$)。しかし、単核球数は投与前 4700 ± 2600 個/cmm、6時間後は 3500 ± 600 個/cmm、24時間後は 4800 ± 7300 個/cmm、48時間後は 1600 ± 1000 個/cmmと有意の変化は認められなかった (表1)。

2. 胸水中好中球遊走活性

Boyden 法でみた胸水の好中球遊走活性はOK-432投与前では 39.5 ± 19.5 、投与6時間後で 87.0 ± 45.1 、24時間後で 40.1 ± 26.0 、48時間後 38.0 ± 11.4 と6時間後 ($p < 0.01$) にピークを有する上昇が認められた。これはOK-432投与後の好中球増加の推移と一致していた (表1)。なおOK-432 (0.1KE/ml) を chemoattractant として用いた場合には好中球の遊走は認められなかった。

3. 胸水中の C5a 活性

OK-432は補体系を活性化することが知られており、補体成分の中で白血球遊走活性を持つとされているC5aの測定を行った。投与前に胸水中C5aが測定可能であった症例は12例中5例 (42%) であり、5例の平均値は 14.6 ± 2.2 ng/mlであっ

表1 OK-432投与による癌性胸水中の細胞組成と好中球遊走活性の変動

Time after OK-432 instillation	Neutrophil		Mononuclear cells		Neutrophil chemotactic activity (cells/hpf)
	percent	count ($\times 10^3/\text{cmm}$)	percent	count ($\times 10^3/\text{cmm}$)	
before	4.41 $\pm$ 1.6	0.26 $\pm$ 0.49	93.6 $\pm$ 1.5	47.0 $\pm$ 26.0	39.5 $\pm$ 19.5
6hr after	86.1 $\pm$ 4.0*	20.6 $\pm$ 11.5*	12.9 $\pm$ 4.0*	35.0 $\pm$ 6.0	87.0 $\pm$ 45.1*
24hr after	63.8 $\pm$ 7.9*	87.0 $\pm$ 60.0*	34.7 $\pm$ 8.1*	48.0 $\pm$ 73.0	40.1 $\pm$ 26.0
48hr after	56.2 $\pm$ 7.6*	26.0 $\pm$ 12.0*	41.9 $\pm$ 4.7*	16.0 $\pm$ 10.0	38.0 $\pm$ 11.4

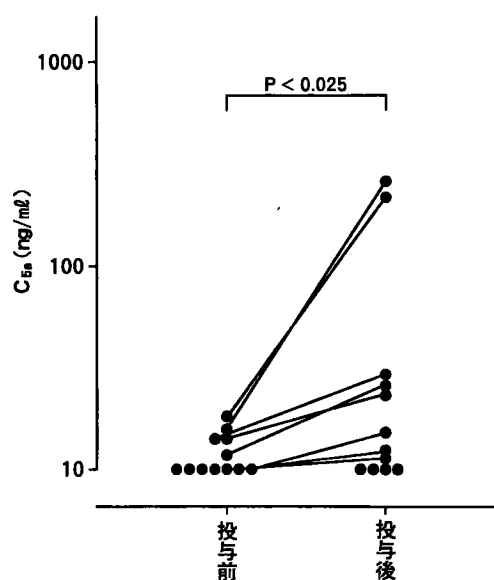
*OK-432投与前に対して有意, $p < 0.01$ 

図1 癌性胸水中の C5a と OK-432 投与の影響

た。OK-432 を投与すると、注入前に測定感度以下であった3例が注入後に測定可能になり、12例中8例(67%)が測定可能であった。またその平均は $86.4 \pm 103.3 \text{ ng/ml}$ と注入前に比し有意の上昇が認められた ($p < 0.01$) (図1)。

4. 胸水中および血清の IL-8 活性

好中球遊走因子の内ケモカインに属する IL-8 の解析を行った。OK-432 投与前の胸水中 IL-8 活性は $2063 \pm 598 \text{ pg/ml}$ と、既に胸水中に IL-8 活性が存在することが判明した。さらに投与6時間後では $9218 \pm 3049 \text{ pg/ml}$ と有意に上昇し ($p < 0.01$)、OK-432 により更に高濃度の IL-8 活性が誘導されていた。血清 IL-8 活性をみ

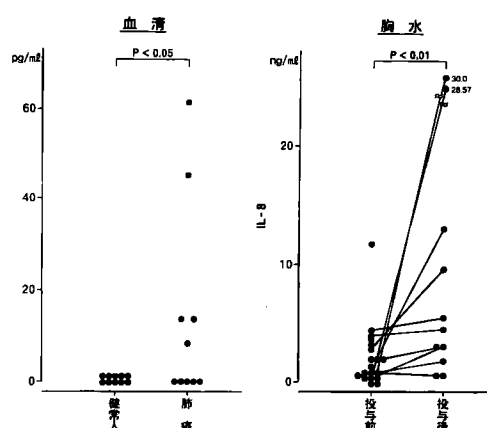


図2 血清および癌性胸水中の IL-8 活性と胸水中 IL-8 活性に及ぼす OK-432 投与の影響

ると健常人では今回の測定法では検出できなかったが、癌性胸膜炎を有する肺癌患者10例中5例にその活性が認められ、 $29.0 \pm 24.1 \text{ pg/ml}$ であった。癌性胸膜炎患者胸水中には血清の約1000倍の IL-8 活性が認められた (図2)。

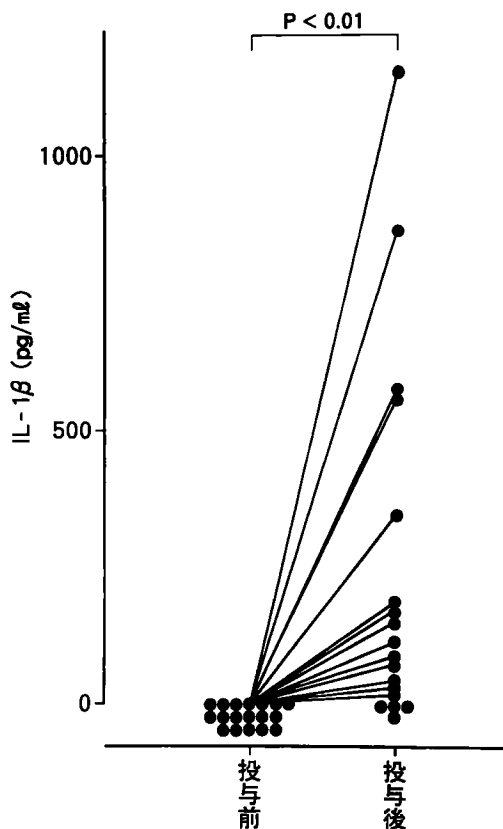
5. 胸水中好中球数、好中球遊走活性、

IL-8 活性の関連

OK-432 投与24時間後の好中球数、好中球遊走活性、IL-8 活性の相関をこれらの項目が同時に観察できた11症例について検討した。好中球遊走活性と好中球数の間には $r = 0.86$ と有意の正の相関 ($p < 0.01$) が認められ、好中球遊走活性の高い症例ほどより多くの好中球が胸水中に動員されていることが判明した。IL-8 活性と好中球数の間にも $r = 0.93$ と有意の ($p < 0.01$) 正の相関がみられ、また IL-8 と好中球遊走活性の間にも $r = 0.85$ と有意の ($p < 0.01$) 正の相関関

表2 OK-432投与24時間後の胸水中好中球数, 好中球遊走活性, IL-8活性の関連

項 目	症例数	相関係数	危険率
好中球数と好中球遊走活性	11	0.861	$p<0.001$
IL-8活性と好中球遊走活性	11	0.853	$p<0.001$
IL-8活性と好中球数	11	0.931	$p<0.001$

図3 癌性胸水中の IL-1 β 活性と OK-432 投与の影響

係が認められた(表2)。C5a と好中球数, 好中球遊走活性の相関もみてみたが, 相関関係は認められなかった。このことより IL-8 は OK-432 投与後の胸水中への好中球動員に大きく寄与していることが窺われた。

6. 胸水中の IL-1 β 活性および IL-6 活性
炎症性サイトカインである IL-1 β および IL-6 の OK-432 投与の影響について観察した。胸水中 IL-1 β 活性は OK-432 投与前には認められなかったが, 投与後は17例中13例に検出され

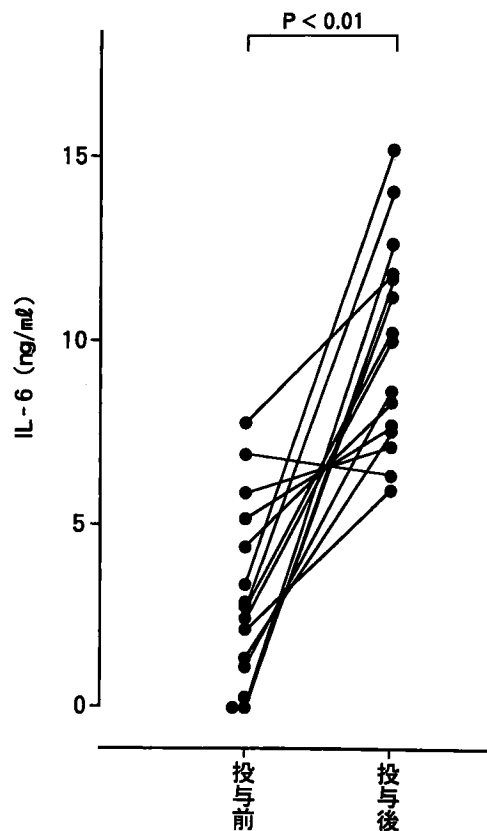


図4 癌性胸水中の IL-6 活性と OK-432 投与の影響

242.78 ± 343.78 pg/ml と投与前に比し有意の上昇が認められた ($p<0.01$) (図3)。IL-6 については投与前は 2.69 ± 2.52 ng/ml であったが, 投与後は 9.35 ± 3.59 ng/ml と有意の上昇が認められた ($p<0.01$) (図4)。

7. 血清および胸水中 sIL-2R 活性

血清 sIL-2R は健常人では 387 ± 135 U/ml に対し, 肺癌患者では 679 ± 402 U/ml と有意に上昇していた ($p<0.01$)。癌性胸膜炎患者胸水中の sIL-2R は 2304 ± 411 U/ml と健常人, 肺癌患者のいずれの血清値に比しても有意の高値を示していた ($p<0.01$)。しかし OK-432 を投与しても胸水中 sIL-2R は 2094 ± 305 U/ml と投与前後で有意な変動は認められなかった (図5)。

考 察

悪性疾患において胸水の貯留は日常診療でし

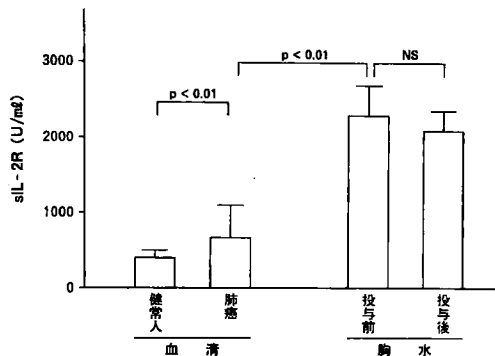


図5 血清および癌性胸水中の sIL-2R 活性と胸水中 sIL-2R 活性に及ぼす OK-432 投与の影響

ばしば遭遇する合併症である。これは癌性胸水あるいは癌性胸膜炎と呼ばれ、悪性疾患の中では特に肺癌、乳癌、悪性リンパ腫等によくみられる⁷⁾。肺癌の進展期症例では30—50%に認められ、予後あるいはQOL (quality of life) を大きく左右する因子の一つである⁸⁾。癌性胸水の治療は全身的な化学療法やBRMはあまり期待できず、主に局所療法がなされている。局所療法は胸水の排除と胸腔への薬剤の注入であり、tetracycline などの胸膜刺激剤、OK-432, Nocardia-CWS, WPG などの BRM や Adriamycin, Bleomycin などの抗癌剤が用いられている⁹⁾。この中で抗癌剤は直接的な抗腫瘍効果と非特異的炎症反応を惹起すると思われるが、胸膜刺激剤や BRM は非特異的炎症反応ばかりでなく、細胞性免疫反応を介して効果を発揮するものと思われる⁷⁾。細胞性免疫反応は癌に対する生体防御反応において重要な役割を担っていることが明らかにされており、この様な担癌宿主の免疫の賦活に用いられる薬剤が BRM である。多くの BRM の中で癌性胸膜炎の治療に臨床的に最もよく用いられ、有効性が認められているものに OK-432がある。OK-432は *Streptococcus pyogenes* (A群3型) Su株由来の菌体成分で、全身的に投与された場合 NK細胞、Tリンパ球、マクロファージ、好中球などの免疫担当細胞を賦活して非特異的に担癌宿主の抗癌抵抗性を発揮するとされている³⁾。OK-432が癌性胸膜炎の治療に用いられた場合もこれらの免疫担当細胞の胸水中への動員、集積により効果を

発揮するものと考えられる。そこで OK-432 により賦活される免疫担当細胞の中で特に好中球に注目し、OK-432 が胸腔内に投与された場合如何なる機序で胸腔内に動員されるかについて検討した。

癌性胸膜炎胸水中の細胞組成をみると、少数の単核球と癌細胞が認められるのみであり、時には癌細胞は認められないこともある。胸腔内に OK-432 が投与された場合の胸水中の細胞組成の変動を経時的に観察したが、投与前数%であった好中球は6時間後には約80%まで著増し、以後漸減していた。好中球の絶対数も比率と同様に6時間後にピークを有する増加が認められた。一方単核球比率は6時間後に低下し、その後増加していたが、絶対数をみると24時間後にやや増加するものの、大きな変動は認められなかった。しかし48時間以降も観察すると次第にマクロファージ、Tリンパ球が増加してくると報告されている⁴⁾。そこで OK-432 投与後著増がみられた好中球の胸水中への遊出に因子について解析した。胸水中の好中球遊走活性を Boyden 法により測定したところ好中球の増加と比例して6時間後に増加していた。しかし OK-432 自体には好中球遊走活性は認められず、この好中球遊走活性の上昇は明らかに OK-432 により誘導されたものと考えられた。

好中球遊走因子はこれまで多くの物質が明らかにされている。代表的なものとして補体由来因子、アラキドン酸由来因子、サイトカイン類、細菌由来因子などが上げられる⁸⁾。そこで OK-432 により如何なる因子が胸中に誘導されるかを検討するため、まず補体由来の C5a の検討を行った。癌性胸水中の C5a は60%の患者でその活性は認められず、残り40%の患者でわずかな活性が認められた。しかし OK-432 が投与された6時間後には70%の患者に C5a 活性が認められ、その平均も著明に増加していた。Fujimura 等は癌性腹水に OK-432 を投与した場合に認められる好中球遊走活性は大部分が C5a であり、抗 C5a 抗体により腹水中に認められた遊走活性は消失すると報告している⁹⁾。また Kondo 等は補体源として新鮮ヒト血清または新鮮凍結漿を OK-432 と同時に腹腔内に投与すると、その臨

床効果を高めたと報告しており、C5aの重要性を強調している¹⁰⁾。

しかし前述の如く好中球遊走因子はC5a以外に多数報告されており、C5a以外にOK-432により好中球遊走因子が誘導されるか否かについて検討した。Yoshimura等はLPS刺激ヒト末梢血単核球培養上清血清中にヒト好中球に対し強い遊走活性を持つ物質を同定し¹¹⁾、現在ではNeutrophil attractant protein-1 (NAP-1) またはinterleukin-8 (IL-8) として広く知られている。今回の検討では健康人血清中にはIL-8活性は検出できなかった。しかし癌性胸膜炎患者ではその半数に活性が認められ、しかも癌性胸水中には血清中の約1000倍の活性が認められた。Sakamoto等は肺癌細胞などの腫瘍細胞がIL-8を産生していると報告しており¹²⁾、OK-432投与前に認められた胸水中のIL-8は腫瘍由来である可能性が示唆された。更にOK-432が投与されるとIL-8活性の有意の上昇が認められ、しかもOK-432投与後の胸水中IL-8活性は好中球数、好中球遊走活性との間に正の相関関係がみられ、IL-8は好中球遊走に対して大きな役割を果たしているものと考えられた。好中球遊走因子はC5aやIL-8以外にもlipid mediatorであるLTB4やplatelet activating factor (PAF)があるが、これらの因子については今回は検討できておらず、OK-432投与時の好中球遊走に参与している可能性が残された⁴⁾。

好中球の炎症局所への集積には好中球遊走因子の濃度差が重要であることは言うまでもない。C5aの胸水中活性はOK-432投与前は認められなかったものの、IL-8は投与前にかなり高濃度で存在していた。しかし胸水中には好中球は殆んど認められず、好中球遊走因子の濃度差のみでは好中球遊走の機序を総て説明することは出来ず、これ以外の機序を考える必要がある。好中球が血管外へ遊出する場合には、好中球の血管内皮細胞上でのrolling (転がり)、内皮細胞へのsticking (粘着)、組織へのmigration (走化)の過程を経るとされている^{13,14)}。このような好中球の血管内より組織への遊出の過程は好中球および血管内皮に発現される種々の接着分子により媒介されることが報告されている^{13,14)}。好中

球遊出に参与する接着分子としてはL-セレクチン (LECAM-1)、E-セレクチン (ELAM-1)、P-セレクチン (GMP-140) などのセレクチンファミリーや好中球に発現されるMac-1やLFA-1などのインテグリンファミリーとそのリガンドとして内皮細胞に発現されるICAM-1がある。セレクチンやICAM-1は通常白血球や血管内皮には発現されておらず、IL-1、TNF- α 、IL-6などの炎症性サイトカインによって初めて誘導されるとされている¹⁴⁾。TNF- α はOK-432により癌性胸水中に誘導されることがすでに明らかにされており¹⁵⁾、従って胸水中IL-1 β およびIL-6のOK-432投与時の変動を検討した。その結果IL-1 β およびIL-6は投与後活性の著しい上昇が認められ、接着分子の誘導にこれら炎症性サイトカインが働いたと考えられた。これらのことによりOK-432投与時の好中球遊走には次のような機序が考えられる。即ちOK-432により炎症性サイトカインが誘導されると血管内皮や好中球にセレクチンが発現し、rollingがおこる。次いでIL-8などのキモカインやC5aなどの好中球遊走因子により好中球が活性化 (triggering) されると、その表面に発現していたインテグリンファミリーの発現増強と質的変化が起こり、血管内皮に誘導されたICAM-1との結合によりstickingが惹起される。最後に好中球遊走因子に対する走化性によりmigrationがおこり、胸水中への好中球の集簇が起こったと考えられた。このような好中球遊出に接着分子が参与していることはC5aによる皮膚への好中球浸潤がインテグリンファミリーに対するモノクローナル抗体 (抗CD18抗体、抗CD11-CD18) によりほぼ完全に抑制され^{16,17)}、またラットのカラゲナン胸膜炎の白血球浸潤が抗ICMA-1抗体により抑制される¹⁸⁾ ことなどからも明らかである。

癌性胸膜炎局所療法の最終目的は胸水中の腫瘍細胞の根絶と胸膜の癒着である。OK-432は胸水中に好中球を誘導し、誘導された好中球はOK-432により更に活性化されて抗腫瘍性に働くと考えられる¹⁹⁾。更に好中球は蛋白分解酵素やスーパーオキシドを放出して、胸膜の損傷や線維化を惹起するものと思われる²⁰⁾。肺の線維化との関連が示唆されている可溶性インターロイ

キン2レセプターも検討したところ²¹⁾, 胸水中では血清に比し高値を示していたが, OK-432投与では変化は認められず, 胸膜の線維化への関与については更に検討が必要であると思われる。更に OK-432 により誘導された IL-1 β , IL-6, TNF- α などは線維芽細胞を増殖させる作用を有しており²²⁾, これらのサイトカインも線維化に関与していることが考えられた。

結 論

癌性胸膜炎患者胸水中の好中球遊走因子の解析を行うとともに, これら因子に対する OK-432 投与の影響について検討した。

1. 癌性胸膜炎患者21例において OK-432 胸腔内投与により 6 時間後にピークを有する胸水中の好中球数および比率の有意の増加が認められた。

2. Boyden法にて測定した胸水の好中球遊走活性は OK-432 投与後 6 時間で有意の上昇が認められた。

3. 好中球遊走活性の時間的推移は好中球数, 比率の時間的推移と一致していた。また OK-432 投与後の好中球遊走活性と好中球数の間には

有意の正の相関関係が認められた。

4. OK-432 投与後, 胸水中の C5a および IL-8 の有意の増加が認められた。また OK-432 投与後の IL-8 活性と好中球数および好中球遊走活性の間にも有意の正の相関が認められた。

5. OK-432 投与後胸水中の IL-1 β および IL-6 の有意の上昇が認められた。

6. 癌性胸水中の sIL-2R は血清値より有意の高値を示していたが, OK-432 を投与しても変動は認められなかった。

以上より OK-432 は好中球遊走因子および炎症性サイトカインを誘導して胸水中に好中球を動員し, これら好中球は腫瘍細胞障害性に働き, 更に線維化を惹起して胸膜癒着を起こすものと考えられた。

本論文を撰筆するにあたり, 御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表します。また, 終始懇篤なる御指導を賜った片岡幹男講師, 大塚泰亮助教授, 医療短期大学部中田安成教授に深謝致します。

(尚, 本論文の要旨は第21回日本臨床免疫学会総会(札幌)にて発表した。)

文 献

- 1) 道端達也, 江口研二: Malignant pleural effusion の治療; Annual Review 呼吸器 1992, 太田保世, 諏訪邦夫, 堀江孝至, 吉村博邦編, 中外医学社, 東京 (1992) pp182—186.
- 2) 長尾啓一: 癌性胸水に対する OK-432 胸腔内投与. Therapeutic Research (1989) 10, 3857—3864.
- 3) 石田名香雄, 斉藤元男: OK-432 の作用機作をわれわれはいかに解明してきたか? Biotherapy (1990) 4, 155—165.
- 4) 近藤元治, 加藤治樹, 鳥巢要道: OK-432 腹腔内投与の効果と薬理作用. Biotherapy (1990) 4, 166—175.
- 5) Cates KL, Ray CE and Quie PG: Modified Boyden chamber measuring polymorphonuclear leukocyte chemotaxis; Leukocyte chemotaxis: Methods, physiology, and clinical implications, Gallin JJ and Quie PG eds, Raven Press, New York (1978) pp67—71.
- 6) 野田和正, 野村郁男: 癌性心のう炎, 癌性胸膜炎の診断と治療. Medicina (1991) 3, 444—446.
- 7) Lin CC, Liu CC and Lin CY: Changes in cell population and tumor necrosis factor, Interleukin-6, and Interleukin-8 in malignant pleural effusions after treatment with intrapleural tetracycline. Am Rev Respir Dis (1993) 147, 1503—1506.
- 8) 山本俊輔, 樋口安典, 手島英雄, 秋月真一郎, 為近慎司, 吉田盛治: 好中球の走化性, 免疫と疾患 (1984) 7, 11—17.
- 9) Fujimura T and Torisu M: Neutrophil-mediated tumor cell destruction in cancer ascites. Clin Immunol Immunopathol (1984) 43, 174—184.

- 10) Kondo M, Kato H, Yoshikawa T and Sugino S : Treatment of cancer ascites by intraperitoneal administration of a streptococcal preparation OK-432 with fresh human complement. *Int J Immunopharmacol* (1986) **8**, 715—721.
- 11) Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ and Leonard EJ : Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes : partial characterization and separation from interleukin 1 (IL-1). *J Immunol* (1987) **139**, 788—793.
- 12) Sakamoto K, Masuda T, Ishiko T, Nakashima Y, Arakawa H, Egami H, Harada S, Matsushima K and Ogawa M : Interleukin-8 is constitutively and commonly produced by various human carcinoma cell lines. *Int J Clin & Lab Res* (1992) **22**, 216—219.
- 13) 玉谷卓也 : 好中球. *臨床免疫* (1993) **25**, 449—455.
- 14) 田中良哉 : 白血球と血管内皮細胞の相互作用. *Mebio* (1993) **10**, 56—64.
- 15) 宮井正博, 松香陽子, 坪田輝彦, 浅野健夫 : OK-432 によるヒト腫瘍壊死因子 (h-TNF) 誘導について. *日本癌治療学会誌* (1986) **21**, 1285—1291.
- 16) Arfos KE, Lundberg C, Lindbom L, Lundberg K, Beatty PG and Harlan JM : A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. *Blood* (1987) **69**, 338—340.
- 17) Lundberg C and Wright SD : Relation of the CD11/CD18 family of leukocyte antigens to the transient neutropenia caused by chemoattractants. *Blood* (1990) **76**, 1240—1245.
- 18) 飯郷 裕, 高子 徹 : 抗接着分子抗体を用いた自己免疫性関節炎の治療 ; 接着分子, 宮坂昌之編, メジカルビュー社, 東京 (1991) pp152—161.
- 19) Torisu M, Hayashi T, Yoshida T, Katano M, Yamamoto H, Fujiwara T, Kimura Y and Takesue M : Neutrophils revisited in tumor immunotherapy ; New horizons of tumor immunotherapy, Torisu M and Yoshida T eds, *Excerpta Medica*, Amsterdam-New York-Oxford (1989) pp101—114.
- 20) Snider GL : Interstitial pulmonary fibrosis : Which cell is the culprit ? *Am Rev Respir Dis* (1983) **127**, 535—539.
- 21) 柴山卓夫 : 肺癌のびまん性肺線維化病態に関する研究. 第2編 肺癌における末梢血インターロイキン2レセプターの検討. *岡山医誌* (1993) **105**, 353—364.
- 22) 小野崎菊夫 : インターロイキン-1 (IL-1). *日本臨床* (1988) **46**, 994—1001.

Neutrophil chemotactic factors induced by OK-432 in the treatment of malignant pleural effusion

Ryouji MORISHITA

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

To investigate the mechanism of neutrophil migration into the pleural effusion in patients undergoing intrapleural immunotherapy with the streptococcal agent OK-432 for malignant pleurisy, we examined the levels of neutrophil chemotactic factor in the pleural fluid. Pleural fluid was collected before and after instillation of OK-432 in 19 patients with lung cancer, one with breast cancer, and one with gastric cancer. First, we evaluated the neutrophil chemotactic activity measured by Byoden's method and the change of the cellular composition of pleural fluid. Neutrophil chemotactic activity was significantly increased 6 hours after the instillation of OK-432, as were the differential neutrophil count and the absolute number of neutrophils. Moreover, there was a close correlation between the absolute neutrophil count and the neutrophil chemotactic activity. We also measured the levels of complement component C5a and interleukin-8 (IL-8), which are thought to be neutrophil chemotactic factor, before and after intrapleural injection of OK-432. The IL-8 and C5a levels were significantly elevated after OK-432 injection. The change of the IL-8 level was associated with a marked increase both in the neutrophil chemotactic activity and in the neutrophil absolute count. In addition, we evaluated the cytokine levels (IL-1 β , IL-6 and soluble interleukin-2 receptor) of pleural fluid before and after OK-432 treatment. The OK-432 treatment induced a marked increase in the levels of IL-1 β and IL-6. However, the pleural fluid level of sIL-2R was not significantly elevated, although it was significantly higher than the serum level.

These findings suggest that OK-432 intrapleural injection induces neutrophil chemotactic factors (IL-8 and C5a) and cytokines (IL-1 β and IL-6), which attracts neutrophils into the pleural space, which may be involved in the mechanism of the sclerosing effect of OK-432.