

14員環マクロライド系抗菌薬の非小細胞肺癌に対する tumor dormancy therapy に関する基礎的・臨床的検討

奈良県立医科大学第2内科学教室

眞島利匡

A PROMISING TUMOR DORMANCY THERAPY USING A 14-MEMBERED MACROLIDE FOR PATIENTS WITH UNRESECTABLE NON-SMALL CELL LUNG CANCER : BASIC AND CLINICAL ANALYSIS

TOSHIMASA MAJIMA

Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received August 18, 2000

Abstract: Clarithromycin (CAM), a 14-membered macrolide, has some effects as a biological response modifier in addition to its antibiotic effects. Long-term CAM treatment has been shown to improve the prognosis of patients with unresectable non-small cell lung cancer, including their quality of life. In the present study, I examined the suppression of Lewis lung carcinoma (LLC) cell proliferation, expression of mRNAs for integrin and TGF- β in LLC cells, suppression of lung metastasis and cytokine mRNA in spleen cells of mice lung cancer model by CAM. Proliferation of LLC cells and the expression of mRNAs for integrin ($\alpha 4$, $\alpha 6$, $\beta 1$) and TGF- β were suppressed by CAM, CAM decreased the number of lung metastasis nodules in LLC-bearing mice. The expression of mRNAs for IL-12 and IFN- γ in spleen cells was increased after CAM treatment. On the contrary, the expression of mRNAs for IL-6 and IL-10 was decreased.

Furthermore I determined the in-vivo effect of CAM on metastasis in unresectable non-small cell lung cancer patients, and cytokine mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients. Incidence of lung cancer metastasis was lower in CAM-treated patients than in untreated ones. The expression of both IL-12 and IFN- γ mRNAs was increased by CAM, while the expression of both IL-6 and IL-10 mRNAs was decreased.

These results suggest that CAM exhibits directly and indirectly antineoplastic activity and that CAM treatment is considered a promising candidate for tumor dormancy therapy. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 50, 304~320, 2000)

Key words: clarithromycin (CAM), non-small cell lung cancer, tumor dormancy therapy, cytokine, metastasis

緒 言

14員環マクロライド系抗菌薬の erythromycin (EM) や clarithromycin (CAM) の長期投与療法がびまん性汎細気管支炎などの難治性慢性下気道感染症の予後を著明

に改善することが報告され¹⁾, その機序の研究が進められている^{2,3,4)}. このマクロライド長期投与療法が従来の急性感染症の抗菌療法と異なる点はマクロライド系抗菌薬が抗菌活性をもたない緑膿菌感染例に有効である点である^{5,6)}. その作用の一つとしてマクロライド系抗菌薬が

宿主免疫に何らかの影響を与えることが明らかにされている。この点に関しては多数の報告があり、EM投与でマウス脾細胞のinterleukin (IL)-1, IL-2の産生増加がみられることが報告され⁹⁾、前田⁹⁾らは慢性下気道感染症患者でマクロライド系抗菌薬投与後に末梢血単核球のIL-2産生能、血清IL-4の増強を認め、マクロライド系抗菌薬がサイトカインを制御している可能性があることを報告している。諸外国でもマクロライド系抗菌薬が抗菌作用以外に好中球やリンパ球機能を制御し、免疫修飾作用を有することを報告している^{7,8)}。濱田⁹⁾らは担癌マウスにEMを投与し、生存率の向上と腫瘍増殖抑制とが認められたことを報告しEMやCAMがbiological response modifier (BRM)作用を有する可能性を示唆している。三笠¹⁰⁾らは切除不能非小細胞肺癌患者にCAMを投与し、生存期間の延長が得られたと報告している。これらの結果に基づき、著者はCAMのtumor dormancy therapyとしての可能性を腫瘍細胞と宿主との両面から基礎的・臨床的に検討し、新たな知見を得た。

材料と方法

1. 基礎的検討

(1) 腫瘍細胞に対するCAMの作用の検討

1) 腫瘍増殖抑制作用

5%非働化牛胎児血清(FBS)加 α -MEM(EAGLE'S MEM NISSUI[®]、日水製薬株式会社、東京)にCAM (Abbot, U. S. A)あるいはampicillin (ABPC)を5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 15 μ g/mlの濃度に添加し、各濃度のCAMあるいはABPC含有 α -MEM中にルイス肺癌細胞(理研細胞銀行、東京)を 1×10^4 細胞/mlに調整後7日間37°C・5%CO₂下で培養した。細胞増殖度はMTT assay (Cell Titer 96[®], Promega, USA)で培養7日後に測定した。実験は5回繰り返し平均値を求めた。

2) integrinおよびtransforming growth factor beta (TGF- β) mRNA発現に与える作用

ルイス肺癌細胞を5%FBS加 α -MEM中に 1×10^6 細胞/mlに調整し、CAM 10 μ g/ml添加群、ABPC 10 μ g/ml添加群、溶媒対照群に分け、37°C・5%CO₂下で24時間24穴平底培養プレートで培養し、ルイス肺癌細胞中のintegrinおよびTGF- β mRNAの発現を検討した。培養終了後、プレートを800g・10分間遠心し、上清を除去後TRIzol[®] (GIBCO BRL, USA)を用いたacid guanidinium-phenol-chloroform method (AGPC法)でルイス肺癌細胞のtotal RNAを単離した。Reverse transcriptase-assisted polymerase chain reaction (RT-PCR)は単離したRNA各検体あたり1 μ gを逆転

写酵素反応緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM DTT], 各1 mMのdATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.25 μ g/ μ l oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (GIBCO BRL, USA), 10単位 ribonuclease inhibitor (東洋紡), 50単位 reverse transcriptase (GIBCO BRL, USA)に混合し、43°C 90分の反応でcDNAに変換した。そのcDNAをPCR緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 25 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂], 各2.5 mMのdATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.25単位 Tap DNA polymerase[®] (GIBCO BRL, USA), integrin $\alpha 4$, αv , $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 3$, TGF- β mRNAおよび β -actin mRNAに特異的なprimer (1 μ M) (Table 1)とに混合し、ミネラルオイルを重層後、thermal cycler (日本ジェネティクス、東京)で94°C 1分, 60°C 1分, 72°C 1分の反応を30 cycleおこなった。PCR産物を1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動で分画し、エチジウムブロマイド染色で各mRNAを検出した。検出した各bandが正確なPCR産物であることを123 bp ladder (GIBCO BRL, USA)を同時に電気泳動して確認した。CCD camera analyzer (Image Master[®], Pharmacia biotech, USA)で染色ゲルを撮影し、発色量を定量し、internal controlとしての β -actin mRNAの定量値に対する比率を求めた。実験は各群5回繰り返し平均値を求めた。

(2) マウス肺転移モデルでの転移抑制作用の検討

6週齢の雌C57BL/6(日本SLC、浜松)にルイス肺癌細胞 3×10^6 細胞/mlを0.1 ml 尾静脈から静注したマウス肺転移モデルでルイス肺癌細胞静脈投与6時間後からCAM投与を開始した。CAMは原末を90%エタノールに2.5 g/mlとなるよう混和して保存、使用時に蒸留水で1000倍希釈し、10 mg/kg/dayを胃管ゾンデで連日強制経口投与した。溶媒対照は0.1%エタノール0.1 mlを用いた。マウスは腫瘍静注14日後に犠牲死させ、肺を採取し肺表面に認められる腫瘍結節数を計測した。実験は各群5匹で3回繰り返し返した。

(3) マウスの宿主免疫への作用

前述のマウス肺転移モデルで腫瘍接種時と腫瘍接種14日後にマウスを犠牲死させ、脾細胞を採取し脾細胞中のtotal RNAをAGPC法で単離した。単離したtotal RNAをcDNAに変換後、IL-6, IL-10, IL-12 mRNA特異的プライマー (Table 1)を用いてPCRを実施後、アガロース電気泳動によりPCR産物を分画した。エチジウムブロマイド染色後CCD camera analyzerで各バンドの発色量を定量化し β -actin mRNAとの比率を求めた。interferon gamma (IFN- γ) mRNAはnorthern

blot hybridization 法で測定した。方法は単離した total RNA 10 μ g を Biodot[®] (Biorad, USA) で nylon membrane (Hybond N⁺, Amersham, Germany) に dot blotting し, IFN- γ mRNA に特異的な digoxigenin labeled probe で hybridization をおこない, 発色反応は nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) を用いた。同様に internal control としての β -actin mRNA を検出した。CCD camera analyzer で β -actin, IFN- γ mRNA の発色を定量化し, IFN- γ mRNA 量の β -actin mRNA に対する比率を求めた。またマウス血清 IFN- γ を enzyme linked immunosorbent assay (Mouse Interferon gamma ELISA[®], ENDOGEN, USA) で測定した。なお, IL-12 は 35 kd の p 35 と 40 kd の p 40 との 2 つの subunit からなり, それらが disulfide binding した異形 2 量体の糖蛋白で両 subunit の発現で生物活性を示すが,

以前のわれわれの報告¹¹⁾ で IL-12 p 35 mRNA の発現は CAM 投与・非投与に関らず認められており, 測定を省略した。実験は各群 5 匹で 3 回繰り返した。

2. 臨床的検討

(1) CAM が非小細胞肺癌の転移におよぼす検討

対象は 1993 年 7 月から 1998 年 6 月の間に当科に入院した III 期の切除不能非小細胞肺癌患者で 6 カ月以上外来で観察可能であった 55 例で, CAM 投与例は 42 例, 男性 36 例, 女性 6 例, 平均 69.3 歳, 組織型は腺癌 15 例, 扁平上皮癌 25 例, 大細胞癌 2 例であった。CAM 非投与例は 13 例, 男性 12 例, 女性 1 例, 平均 63.7 歳, 組織型は腺癌 7 例, 扁平上皮癌 6 例であった。CAM 投与群・非投与群間には性別・年齢・組織型・Performance status (P. S.)・入院中の抗癌治療の内容に有意差は認められなかった (Table 2)。

対象患者は入院後, 化学療法・放射線療法などの抗癌

Table 1. PCR primers used in mouse study and PCR product size

		Sequence	PCR products (bp)
$\alpha 4$	sense	5'- TCCAAAAATCCCCTATCCTCTC	660
	antisense	5'- AAGCCATCCTGCTGCAAAC	
αv	sense	5'- GTTGGGAGATTAGACAGAGGA	288
	antisense	5'- CAAAAACAGCCAGTAGCAACAA	
$\alpha 6$	sense	5'- AAATACCAGACTCTCAACTGCA	517
	antisense	5'- TGAAACTGTAGGTCCATACTGG	
$\beta 1$	sense	5'- TGTTCATGCCAGAGCCTTCA	452
	antisense	5'- CCTCATACTTCGGATTGACC	
$\beta 3$	sense	5'- GGGGACTGCCTGTGTGACTC	521
	antisense	5'- CTTTTCGGTCGTGGATGGTG	
TGF- β	sense	5'- TGGACCGCAACAACGCCATCTATGAGAAAACC	525
	antisense	5'- TGGAGCTGAAGCAATAGTTGGTATCCAGGGCT	
IL-6	sense	5'- ACTGATGCTGGTGACAACCACG	211
	antisense	5'- GTTTTCTGCAAGTGCAATCATCG	
IL-10	sense	5'- CTCTTACTGACTGGCATGAGGATC	475
	antisense	5'- CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAAATT	
IL-12	sense	5'- AACTGGCGTTGGAAGCACGG	368
	antisense	5'- GAACACATGCCCCACTTGCTG	
β -actin	sense	5'- CTGAAGTACCCCATGAACATGGC	514
	antisense	5'- CAGAGCAGTAATCTCCTTCTGCAT	

Table 2. Characteristics of non-small cell lung cancer patients

Factors	CAM (n=42)	Non-CAM (n=13)
Gender (M/F)	36/6	12/1
Mean age (year)	69.3	63.7
Histology (Ad/Sq/La)	15/25/2	7/6/0
P. S. (0/1/2/3)	6/19/9/8	2/9/2/0
Basic treatment (CT/CT+R/R/NT)	5/23/10/4	1/8/4/0

CT : chemotherapy, R : radiation, NT : no therapy

Ad : adenocarcinoma, Sq : squamous cell carcinoma, La : large cell carcinoma

P. S. : performance status

治療を受け、退院前にガリウムシンチグラム・骨シンチグラム・腹部超音波検査・頭部CT・胸部CTで転移のないことを確認し退院した。

抗癌治療終了後約4週後に十分なインフォームドコン

セントを得た後、CAM 200 mg を1日2回経口投与した。CAM投与開始6カ月後に再度ガリウムシンチグラム・骨シンチグラム・腹部超音波検査・頭部CT・胸部CTで転移の有無と部位を検索した(Table 3)。

Table 3. Schedule of CAM treatment

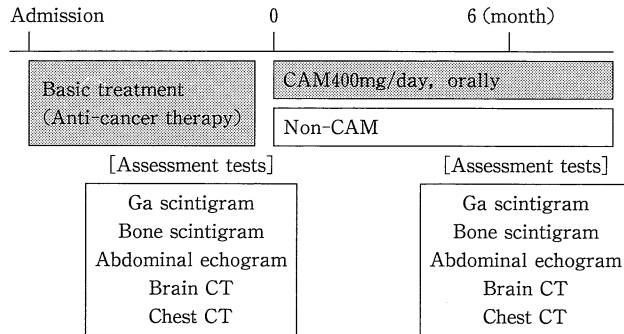


Table 4. Patient characteristics

Case No.	Age	Gender	Histology	Stage	Basic chemotherapy	Response
1	56	M	Sq	III	MVP+RT	PR
2	62	M	Sq	III	MVP+RT	NC
3	74	M	Sq	III	MVP+RT	PR
4	75	F	Sq	III	MVP+RT	PR
5	67	M	Sq	III	MVP+RT	PR
6	78	M	Ad	III	MVP+RT	PD
7	70	M	Sq	III	CBDCA+VP-16	PR
8	76	M	Sq	III	RT	NC
9	33	M	Sq	IV	MVP+RT	PR
10	64	M	Sq	IV	MVP+RT	NC
11	55	F	Sq	IV	MVP	PR
12	52	M	Ad	IV	MVP	NC
13	80	F	Ad	II	RT	NC

Ad : Adenocarcinoma, Sq : Squamous cell carcinoma
 MVP : MMC+VDS+CDDP, RT : radiation therapy
 PR : partial response, NC : no change, PD : progressive disease

Table 5. PCR primers used in clinical study and PCR product size

		sequence	PCR products size (bp)
G3PDH	sense	5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3'	983bp
	antisense	5'-CATGTGGCCATGAGGTCCACCAC-3'	
IL-10	sense	5'-AAGGATCCATGCACAGCTCAGCACTGC-3'	204bp
	antisense	5'-CGACTGGGTCGGGAACTCTTAAGA-3'	
IL-12	sense	5'-GGACCAGAGCAGTGAGGTCTT-3'	373bp
	antisense	5'-CTCCTTGTTGTCCCCTCTGA-3'	
IFN- γ	sense	5'-ATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTT-3'	416bp
	antisense	5'-GATGCTCTTGGACCTCGAAACAGCAT-3'	

(2)CAM の非小細胞肺癌患者宿主免疫への作用

1)抗癌治療施行例

対象は切除不能原発性非小細胞肺癌患者 13 例, 男性 10 例, 女性 3 例, 平均年齢 65 歳, 臨床病期はII期 1 例, III期 8 例, IV期 4 例, 組織型は扁平上皮癌 10 例, 腺癌 3 例であった. 抗癌治療は化学療法・放射線療法併用は 8 例, 放射線単独治療 2 例, 化学療法単独治療 3 例, 効果は partial response 7 例, no change 5 例, progressive disease 1 例であった(Table 4).

抗癌治療終了約 4 週後にインフォームドコンセントを得た後, CAM 200 mg を 1 日 2 回経口投与した. CAM 投与前, 投与 1 カ月後, 3 カ月後に末梢静脈からヘパリン加採血をおこない, Ficol-Paque research grade® (Pharmacia Biotech, USA)を用いた比重遠心法で単核球を分離した. AGPC 法で抽出した total RNA 1 µg を cDNA に変換後, IL-10, IL-12, IFN-γ mRNA 特異的プライマー (Table 5)を用いて PCR を実施した. 得られた PCR 産物を 1.5 %アガロースゲル電気泳動で分画し, エチジウムブロマイド染色後, CCD camera analyzer で撮影, 発色量を定量化し, internal control としての glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G 3 PDH) mRNA の定量値に対する比率を求めた.

Table 6. Patient characteristics

Case No.	Age	Gender	Histology	Stage	P.S.
1	60	F	Ad	IV	1
2	73	F	Ad	IV	1
3	78	M	Sq	IIIa	2
4	79	M	Ad	IV	3
5	84	M	Ad	IIIb	1

Ad : adenocarcinoma, Sq : squamous cell carcinoma
P.S. : performance status

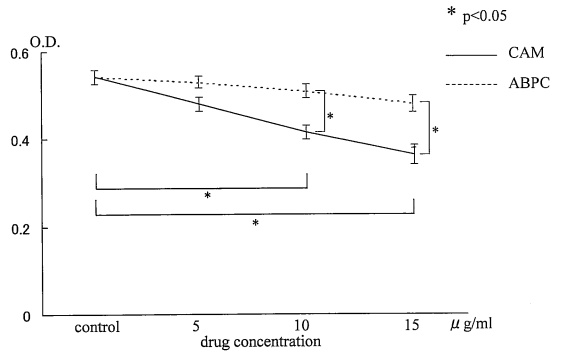


Fig. 1. Suppression of Lewis lung carcinoma cell proliferation by CAM
Data are presented as means ± S.E.

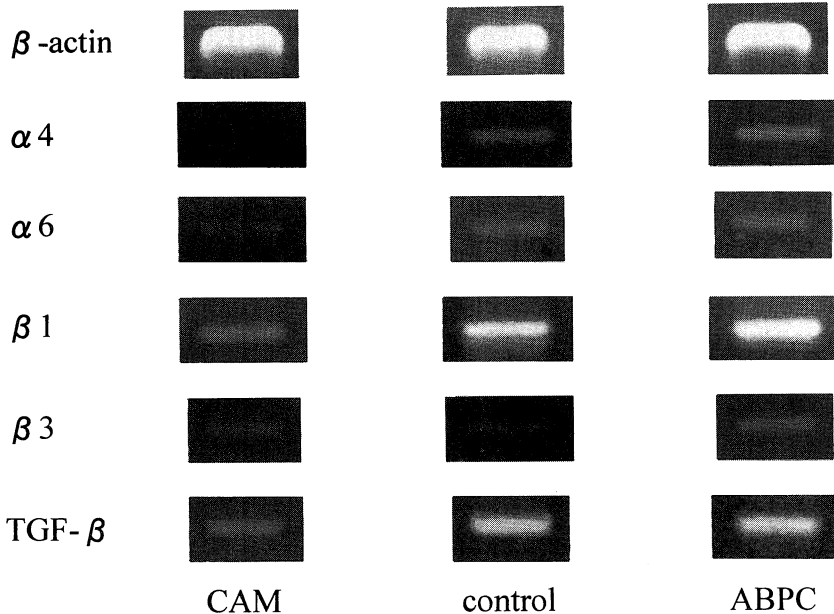


Fig. 2. Expression of mRNAs for integrin and TGF-β in Lewis lung carcinoma cells culture with CAM or ABPC

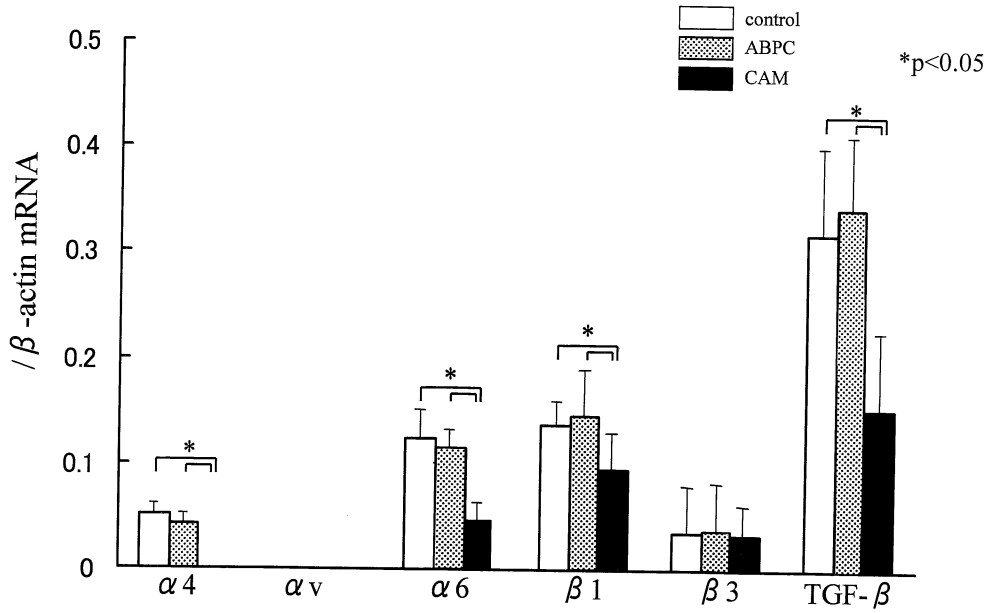


Fig. 3. Changes in the expression of mRNAs for integrin and TGF-β in Lewis lung carcinoma cells after culture with CAM for 24 hours
Data are presented as means ± S.E.

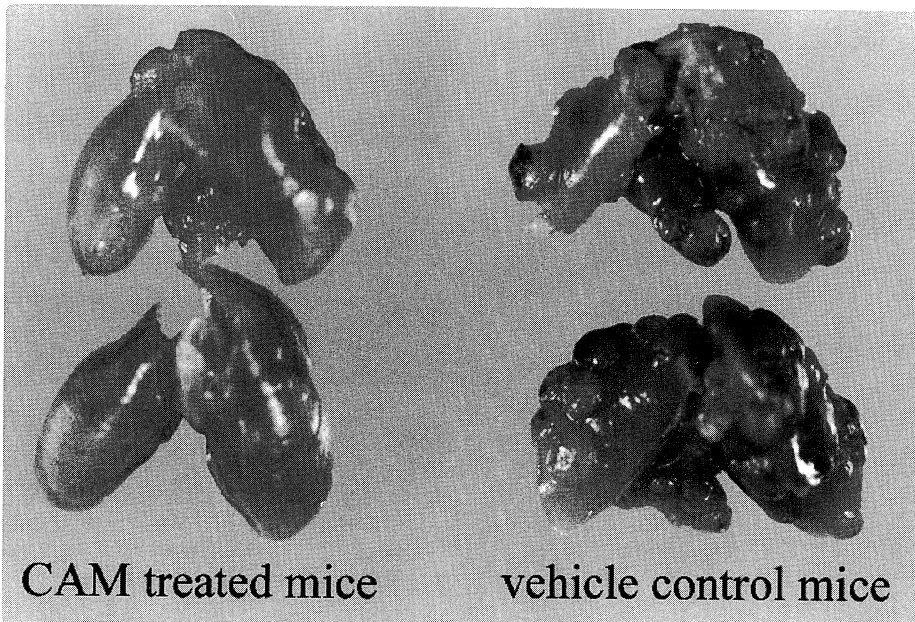


Fig. 4. Lung tumors of mice intravenously injected with Lewis lung carcinoma cells

2) 抗癌治療非施行例(CAM 単独投与例)

対象は本人の意志・高齢・PS 不良・病期進行などの理由で抗癌化学療法や放射線療法を受けなかった非小細胞肺癌患者 5 例, 男性 3 例, 女性 2 例, 平均年齢 74 歳, 臨床病期はIII期 2 例, IV期 3 例, 組織型は扁平上皮癌 1 例, 腺癌 4 例であった。(Table 6).

診断後十分なインフォームドコンセントをおこない CAM 200 mg を 1 日 2 回経口投与し, 投与前, 投与 1 カ

月後, 3 カ月後に末梢静脈からへパリン加採血をおこない, Ficol - Paque research grade® (Pharmacia Biotech, USA)を用いた比重遠心法で単核球を分離した. AGPC 法で抽出した total RNA 1 µg を cDNA に変換後, 各サイトカイン特異的プライマー(Table 5)を用いて PCR を実施した. PCR cycle は 25 回とし, 得られた PCR 産物を 1.5 %アガロースゲルで電気泳動後, Nylon membrane (Hybond N+®, Amersham, Germany)に転写し, G 3 PDH, IL-10, IL-12, IFN-γ mRNA に特異的な digoxigenin labeled probe で southern blot hybridization をおこない, NBT/BCIP で発色反応をおこなった. CCD camera analyzer でメンブレンを撮影後, 各バンドの発色量を定量し, internal control としての G 3 PDH mRNA のバンド発色量に対する比率を求めた.

3. 統計学的処理

統計学的処理は Student's t-test を用い, 危険率 5 % 未満を有意差ありとした.

結 果

1. 基礎的検討

(1) 腫瘍細胞に対する CAM の作用の検討

1) 腫瘍増殖抑制作用

CAM は 10 µg/ml 以上の濃度で濃度依存性にルイス

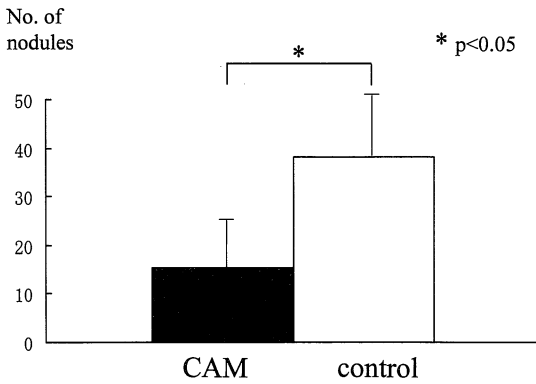


Fig. 5. Comparison of lung metastatic nodule numbers between the CAM treated group and the vehicle control group

Data are presented as means ± S.E.

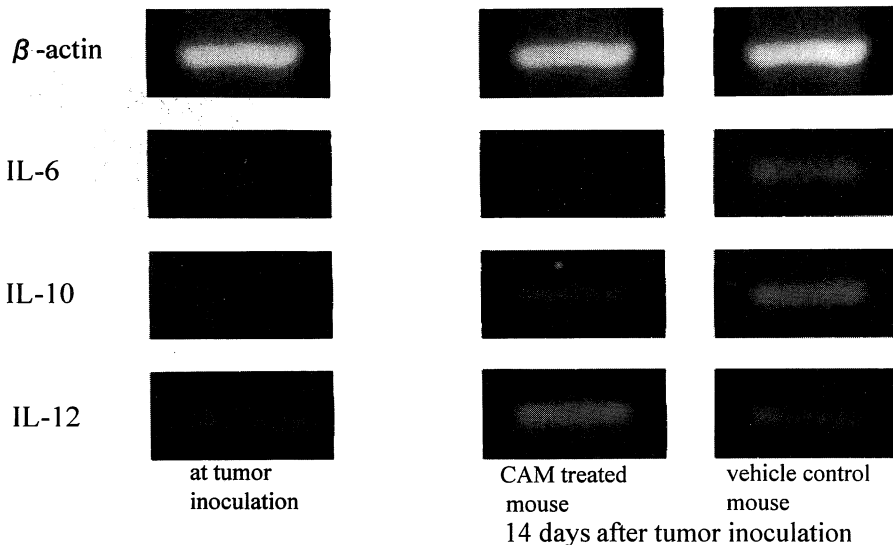


Fig. 6. Changes in the expression of cytokine mRNAs in mouse spleen cells by CAM treatment

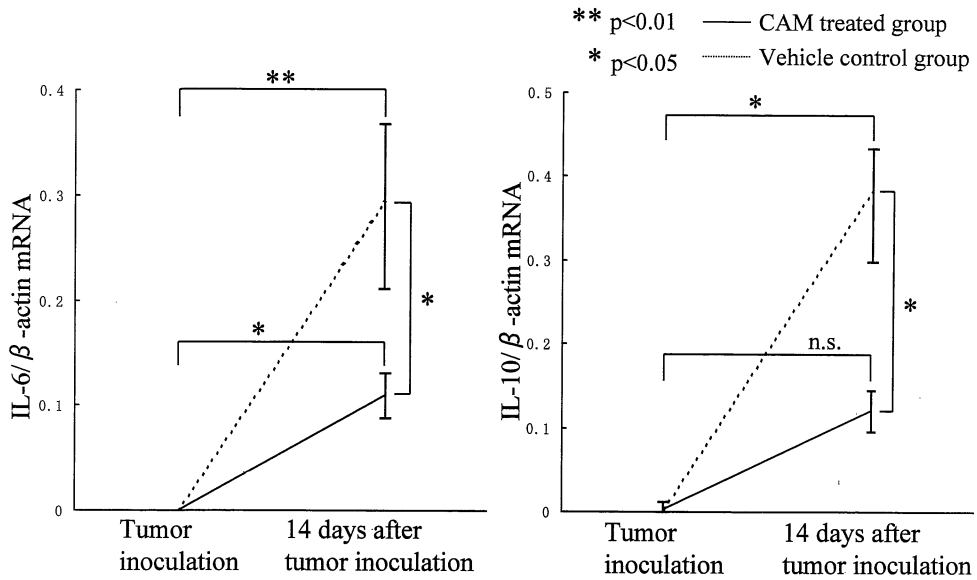


Fig. 7. Changes in the expression of mRNAs for IL-6 and IL-10 in mouse spleen cells by CAM treatment
 Data are presented as means \pm S.E.

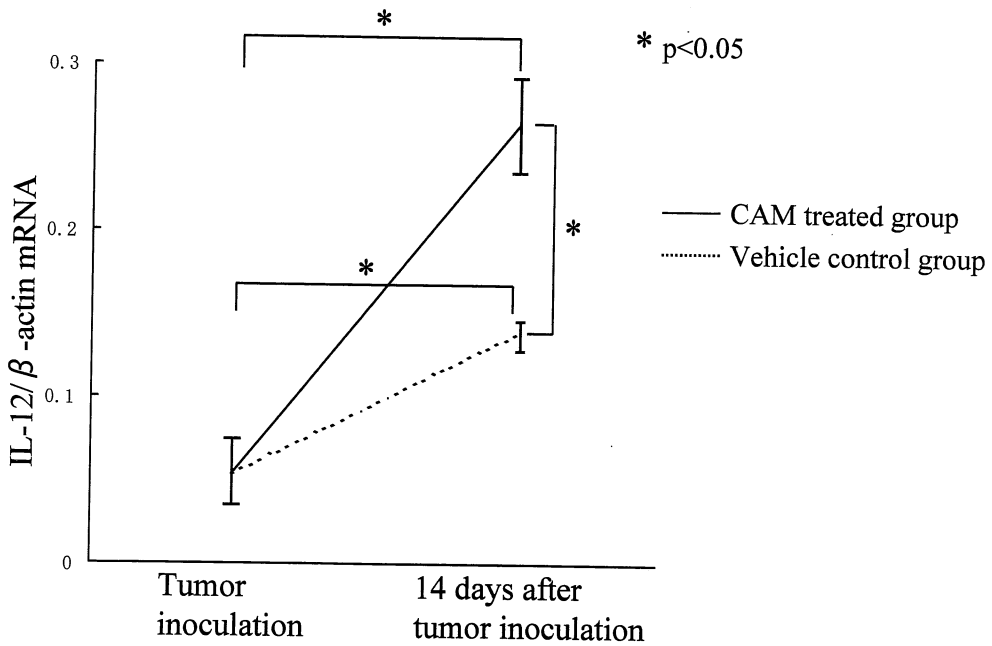


Fig. 8. Changes in the expression of IL-12 mRNA in mouse spleen cells by CAM treatment
 Data are presented as means \pm S.E.

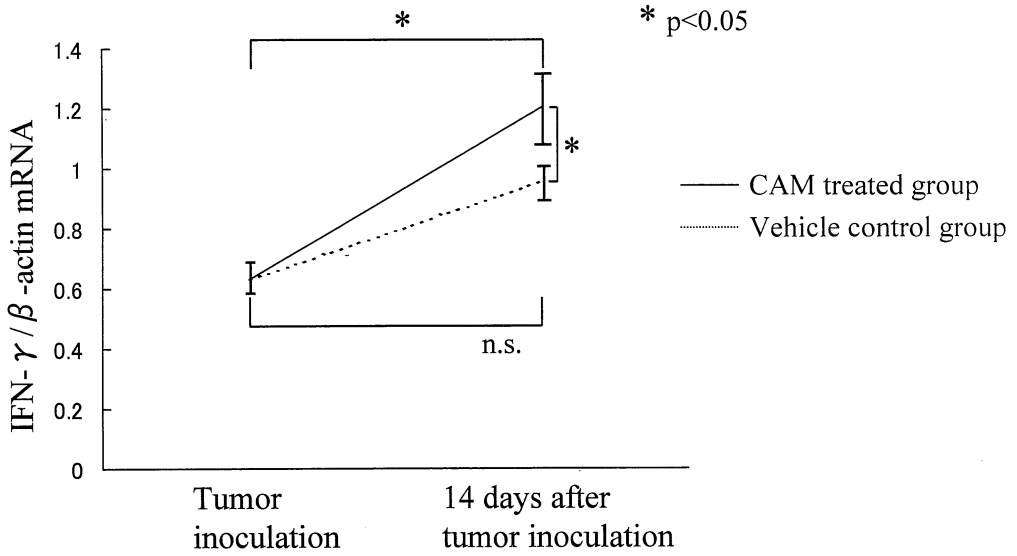


Fig. 9. Changes in the expression of IFN- γ mRNA in mouse spleen cells (northern blot hybridization)
Data are presented as means \pm S.E.

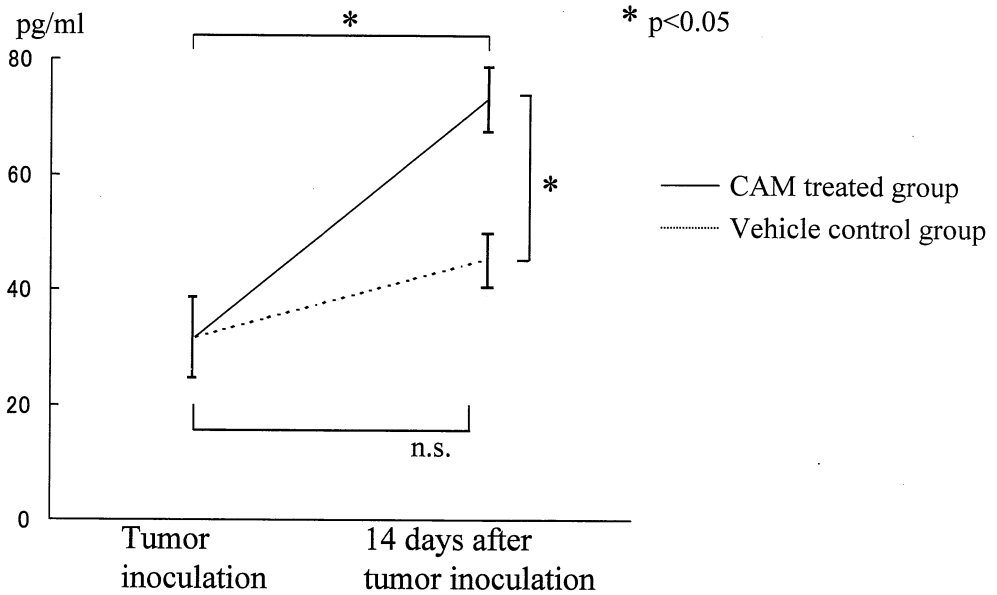


Fig. 10. Changes in serum levels of IFN- γ in tumor-bearing mice after CAM treatment (ELISA)
Data are presented as means \pm S.E.

肺癌細胞の増殖を有意に抑制し($p < 0.05$), ABPCは15 $\mu\text{g/ml}$ までの濃度では増殖は抑制せず, CAMとABPCとでは10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で生細胞数に有意差がみられた($p < 0.05$)(Fig. 1).

2) integrin および TGF- β mRNA 発現に与える作用

発現が認められた各 mRNA 中, $\beta 3$ integrin を除く $\alpha 4, \alpha 6, \beta 1$ integrin, TGF- β , mRNA 発現が対照群と比較して, CAM の添加で減弱傾向を認めた(Fig. 2).

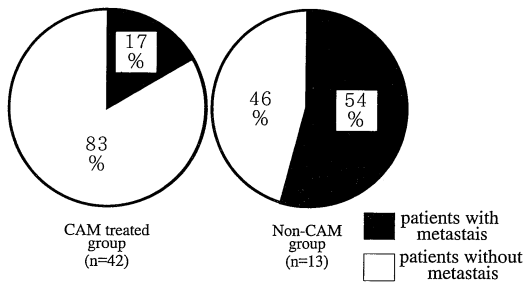


Fig. 11. Incidence of metastasis in patients with non-small cell lung cancer after 6 months of CAM treatment

αv integrin mRNA は発現が認められなかった,

また比較定量の結果, $\alpha 4, \alpha 6, \beta 1$ integrin TGF- β mRNA が, 対照と比較して CAM の添加で有意に抑制されていた($p < 0.05$). なお, 発現した integrin, TGF- β mRNA は対照群および ABPC 添加群との間に有意差は認められなかった(Fig. 3).

(2) マウス肺転移モデルでの転移抑制作用の検討

14 日後の肺表面の転移結節は肉眼的に CAM 非投与群と比較して CAM 投与群の方が少数で(Fig. 4), 統計学的にも CAM 非投与群と比較して CAM 投与群の方が有意に少数であった($p < 0.05$)(Fig. 5).

(3) マウスの宿主免疫への作用

IL-6, IL-10 mRNA は腫瘍接種前には発現が認められなかったが, 腫瘍接種 14 日後に CAM 投与群, CAM 非投与群ともに発現が認められるようになり, CAM 投与群は CAM 非投与群に比べて発現は減弱傾向であった.

IL-12 mRNA は腫瘍接種 14 日後に CAM 非投与群では若干の増強傾向を認めたのみであったが, CAM 投与群では著明な増強が認められた(Fig. 6).

比較定量の結果, 腫瘍接種 14 日後の IL-6 mRNA は CAM 投与群($p < 0.05$), CAM 非投与群($p < 0.01$)で有意に上昇したが, CAM 投与群は CAM 非投与群に比べ

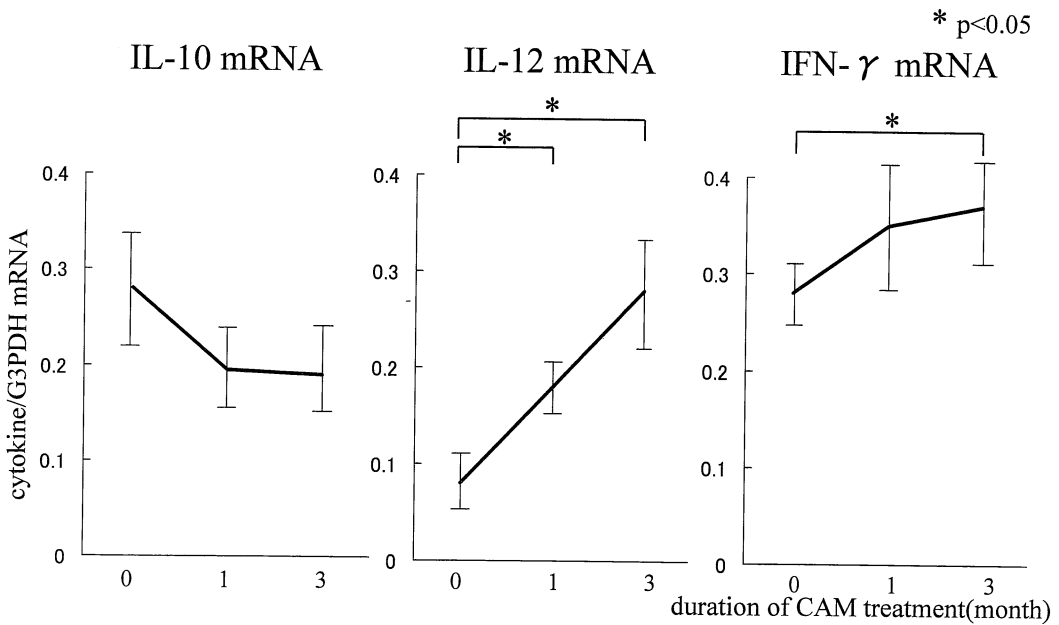


Fig. 12. Changes in the expression of cytokine mRNAs in peripheral blood mononuclear cells during CAM treatment
Data are presented as means \pm S.E.

て有意に発現量は低値であった($p < 0.05$). 一方, IL-10 mRNA はCAM 非投与群でのみ優位に上昇し($p < 0.05$), CAM 投与群はCAM 非投与群に比べて有意に低値であった($p < 0.05$)(Fig. 7). IL-12 mRNA は腫瘍接種 14 日後でCAM 投与群は腫瘍接種時より有意に上昇し($p < 0.05$), CAM 投与群はCAM 非投与群より有意に

高値であった($p < 0.05$)(Fig. 8). また, northern blot hybridization による IFN- γ mRNA は発現比較においても IL-12 と同様にCAM 投与群では腫瘍接種 14 日後で腫瘍接種時と比較して, さらにCAM 非投与群と比較して, 共に有意に高値であった($p < 0.05$)(Fig. 9).

さらに血清 IFN- γ もCAM 投与群では腫瘍接種 14

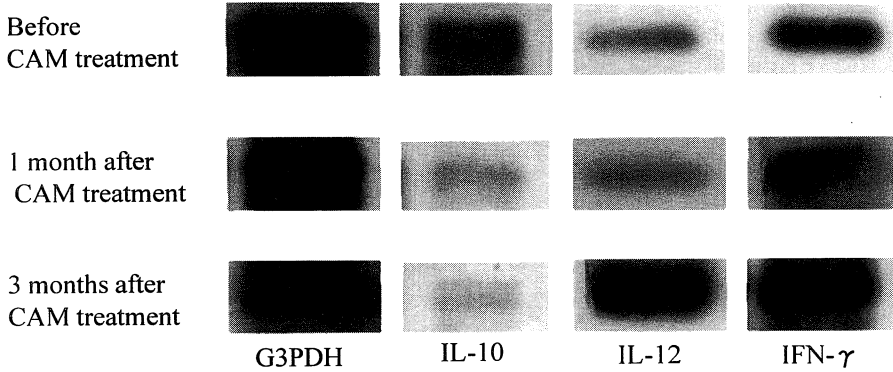


Fig. 13. Changes in the expression of cytokine mRNAs in peripheral blood mononuclear cells during 3 months of CAM treatment (southern blot hybridization)

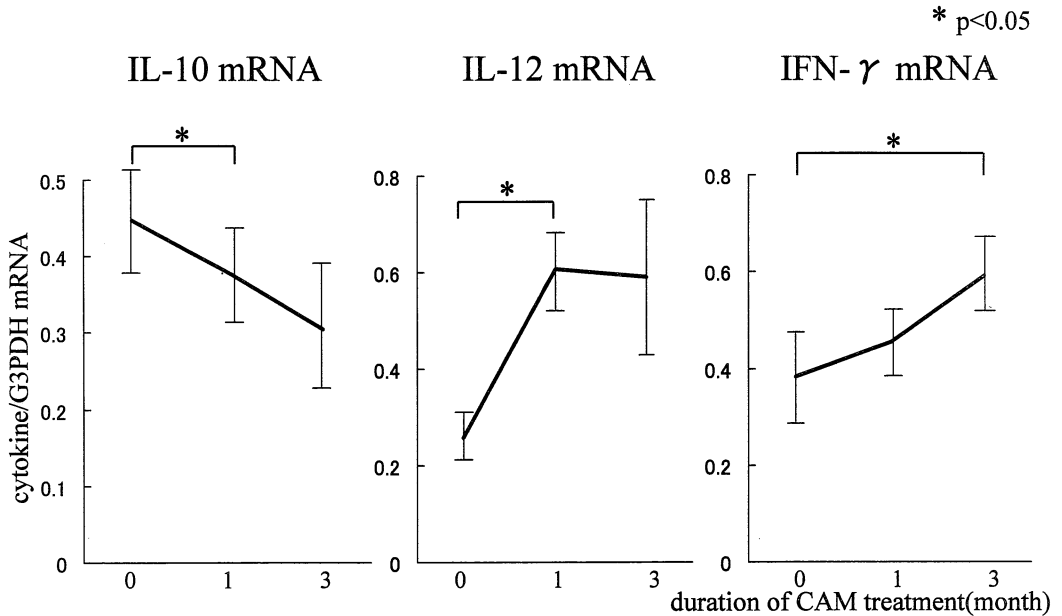


Fig. 14. Changes in the expression levels of cytokine mRNAs in peripheral blood mononuclear cells during 3 months of CAM treatment Data are presented as means \pm S.E.

日後に有意な上昇が認められ($p < 0.05$), CAM 非投与群に比較して有意に高値であった($p < 0.05$) (Fig. 10).

2. 臨床的検討

(1) CAM が非小細胞癌の転移におよぼす検討

投与 6 カ月後に転移が認められたのは CAM 投与群 17%, CAM 非投与群 54% と CAM 投与群のほうが転移例は少なかった (Fig. 11). 転移部位には CAM 投与群・非投与群間に差は認めなかった (Table 7).

(2) CAM の非小細胞肺癌患者宿主免疫への影響

1) 抗癌治療施行例

比較定量の結果, IL-10 mRNA では CAM 投与後に抑制傾向が認められた. IL-12 mRNA は投与前に比較して, 投与 1 カ月後から有意に発現の増強が認められ ($p < 0.05$), IFN- γ mRNA でも投与 3 カ月後に有意に発現の増強が認められた ($p < 0.05$) (Fig. 12). IL-12 mRNA の発現が増強した 9 例中 7 例で IFN- γ mRNA の発現が増強し, IL-10 mRNA の発現は 8 例で抑制された. IL

-12 mRNA の増強が認められた症例の多くで IFN- γ mRNA も増強し, IL-10 mRNA は抑制が認められた. 一方, IL-12 mRNA の発現が増強しなかった 4 例の中では, 3 例で IFN- γ mRNA の発現増強が認められず, 全症例で IL-10 mRNA の発現抑制は認められなかった (Table 8).

2) 抗癌治療非施行例 (CAM 単独投与例)

IL-10 mRNA は CAM 投与開始 1 カ月後・3 カ月後ともに投与前に比較して減弱していた. IL-12 mRNA と IFN- γ mRNA とは投与開始 1 カ月後では投与前とほぼ同様の発現が認められたが, 投与 3 カ月後には投与前に比較して増強した (Fig. 13).

比較定量の結果, IL-10 mRNA は CAM 投与後に有意に抑制され ($p < 0.05$), IL-12, IFN- γ mRNA はともに投与後に有意に増強した ($p < 0.05$) (Fig. 14).

考 察

近年肺癌は成人男子の死因の第 1 位となり, 特に非小細胞肺癌は抗癌薬や放射線の感受性も低く, 手術以外に有効な治療法はなく, 最近では QOL の向上と延命を目的とした新たな治療法の開発が望まれている^{12,13}).

一方, CAM がびまん性汎細気管支炎などの難治性慢性下気道感染症の症状・予後・QOL の改善をもたらし¹⁾, その機序に宿主の免疫制御が関連することが示唆されるようになった²⁾³⁾. そこで QOL を考慮した生存期間の延長を目的とした新しい治療法として, 14 員環マクロライド系抗菌薬による非小細胞肺癌に対する tumor dormancy therapy の可能性を検討した.

Table 7. Analysis of metastasis organ

	CAM treated group (n=7)	Non-CAM group (n=7)
brain	3	3
bone	2	3
liver	1	0
adrenal gland	0	2
cervical		
lymphnode	1	0

n=incidence of metastasis

Table 8. Alteration of cytokine mRNA expression in patients with or without the enhanced expression of IL-12 mRNA

Case No.*	Changes in expression levels of IFN- γ mRNA	Changes in expression levels of IL-10 mRNA
1	↑	↓
2	↑	↓
4	↑	↓
patients whose IL-12 mRNA expression was enhanced	5	↓
	7	↓
	12	↓
	3	↑
	6	↓
13	↓	↓
patients whose IL-12 mRNA expression was not enhanced	8	↑
	9	↑
	10	↑
	11	↑

*Case number is same as Table. 4

tumor dormancy therapy は宿主免疫賦活、腫瘍増殖能低下、血管新生抑制作用などを利用して宿主と腫瘍との共存をはかる治療概念である^{14,15}。本研究では14員環マクロライド系抗細菌薬が非小細胞肺癌の tumor dormancy therapy になり得るかを腫瘍細胞への影響と宿主の免疫制御機構について検討した。

腫瘍細胞に CAM が与える影響を腫瘍細胞の増殖、integrin および TGF- β mRNA を検討し、肺転移抑制効果をマウス肺転移モデルで検討した。

CAM の細胞増殖抑制作用は正常マウスリンパ球や Ehrlich ascitis carcinoma に対しては 50 $\mu\text{g/ml}$ までの濃度で細胞毒性・細胞増殖抑制は認められておらず、その作用機序は細胞毒性でないことが推察されるが今後さらに検討を要する。本研究の結果から CAM は原発巣、転移部分のルイス肺癌細胞増殖を抑制し、腫瘍の増殖、進行を抑制する可能性が示唆された。

ルイス肺癌細胞には $\alpha 4$, αv , $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 3$ 中 $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 3$ mRNA の発現が認められており、CAM 投与で $\alpha 4$, $\alpha 6$ および $\beta 1$ mRNA 発現が抑制された。腫瘍の転移は原発巣から血管内に散布された腫瘍細胞が Liotta の浸潤の3段階説でいわれるように接着・分解・移動の段階を経て進行する^{16,17}。転移を制御するにはこれらのいずれかの段階、あるいは複数の段階を抑制する必要がある。細胞接着に関与する接着分子の中で大きな役割を持つのが integrin family である。integrin は α , β 鎖が非共有結合で会合しているヘテロダイマーで細胞膜に発現している。この α , β 鎖の組み合わせでさまざまな ligand と結合する^{18,19}。癌細胞ではその発現で ligand への接着性が高まり転移性が高まることが報告されている^{20,21}。ルイス肺癌細胞で発現が認められ CAM で抑制された integrin の α 鎖と β 鎖の組み合わせは $\alpha 4 \beta 1$ と $\alpha 6 \beta 1$ とである。 $\alpha 4 \beta 1$ (VLA-4) はフィブロネクチンと VCAM-1 を ligand としており、白血球や種々の癌細胞に存在している^{22,23,24}。一方、 $\alpha 6 \beta 1$ (VLA-6) はラミニンを ligand としており、多種の細胞に存在している^{24,25,26,27}。とくに $\alpha 4 \beta 1$ (VLA-4) の発現は転移に大きく関与している報告もある²⁰。マウス肺癌転移モデルでも、CAM 投与で転移が抑制されたが、CAM による $\alpha 4 \beta 1$ と $\alpha 6 \beta 1$ mRNA の発現抑制が血管内皮、細胞外マトリックス、間質細胞と腫瘍細胞との接着を抑制し、転移抑制に関与している可能性が示唆される。

TGF- β は肝細胞以外のほとんどの細胞が産生し、線維芽細胞増殖、リンパ球・上皮細胞増殖抑制など多様な作用を有している²⁸。TGF- β は腫瘍細胞には増殖抑制に働く機能を有しているが、多くの腫瘍細胞では TGF-

β の増殖抑制作用に対する反応性は失われているといわれている²⁹。また腫瘍自身から TGF- β が多く産生されているという報告もある^{30,31}。血管内皮細胞には in vivo では特に腫瘍組織周辺では血管新生促進作用を有している^{31,32}。腫瘍自身の TGF- β 産生は TGF- β の線維芽細胞増殖促進作用により腫瘍周囲の線維化を促進させる作用がある²⁸。さらに腫瘍細胞が大量に TGF- β を産出すると腫瘍の進展はより進行するといわれている³³。また、TGF- β は宿主の免疫能を抑制するため、腫瘍に対する生体の免疫応答が減弱する^{34,35,36}。これらのことから担癌宿主では TGF- β 産生を抑制することが望まれる。ルイス肺癌細胞にも TGF- β mRNA の産生が認められたことから、本腫瘍細胞の増殖・進展に TGF- β が関与している可能性が示唆される。CAM は TGF- β mRNA 発現を抑制したことから、腫瘍の進展・血管新生を抑制し、TGF- β 依存性宿主免疫能低下を改善し得る可能性が示唆された。これらのことから CAM は腫瘍細胞自身に作用し転移・腫瘍増殖を抑制している可能性が示唆される。

CAM が担癌宿主におよぼす作用を検討するためマウス肺癌モデルの脾細胞のサイトカイン mRNA を検討した結果、CAM 投与後に IL-6 および IL-10 mRNA が抑制され、IL-12 および IFN- γ mRNA が増強された。臨床的検討でも同様に IL-10 mRNA が抑制され、IL-12 および IFN- γ mRNA が増強していた。

担癌初期状態では宿主は腫瘍局所や末梢血で抗腫瘍免疫が活性化し、IL-2, IL-12 および IFN- γ などの Th-1 サイトカインが産生されるが、その後はこれらの Th-1 サイトカイン産生は徐々に低下するようになる。これは腫瘍の進行で細胞性免疫が低下するためと考えられている^{37,38}。抗腫瘍活性を有する IL-12 は T 細胞からの IFN- γ の誘導因子であるとともに、T 細胞の分化を Th 1 表現型へと誘導する機能があり、細胞性免疫の重要な機能を持つ³⁹。また、腫瘍接種マウスに recombinant IL-12 を腹腔内に投与すると腫瘍の縮小・消失効果があり、非常に強い抗腫瘍効果を持つことが判明している⁴⁰。腫瘍の進行とともに抗腫瘍活性が低下する一方で、IL-6, TNF- α などの Th 2 サイトカイン産生が腫瘍局所、全身で増加し、担癌宿主に癌悪液質が生じる要因となっている^{41,42,43}。また、IL-10 は T 細胞の IFN- γ 産生を抑制し、NK 活性の抑制作用がある⁴⁴。

本研究のマウス肺癌モデルでは、CAM 投与後に Th 1 サイトカインの IL-12 および IFN- γ mRNA は増強し、Th 2 サイトカインの IL-6 および IL-10 mRNA は抑制されていた。非小細胞肺癌患者に抗癌化学療法を行った症例では、CAM 投与後に Th 1 サイトカインの IL-12 お

よび IFN- γ mRNA は増強し, Th 2 サイトカインの IL-10 mRNA は抑制されていた. 症例別にみると IL-12 mRNA が CAM 投与後に増強した患者では IFN- γ mRNA も増強し, IL-10 mRNA は抑制されていた. これらの事実は, IFN- γ mRNA 発現の増強が IL-10 の産生抑制と IL-12 の誘導産生に基いている可能性を示唆するものである. また, 抗癌治療を受けなかった非小細胞肺癌患者でも, CAM 投与で Th 1 サイトカインの IL-12 および IFN- γ mRNA 発現は増強し, Th 2 サイトカインの IL-10 mRNA 発現は抑制されていた. このことから, 抗癌治療の影響に関係なく CAM 単独の効果としてサイトカイン産生パターンは Th 1 優位に導かれるものと考えられた.

以上の結果から切除不能非小細胞肺癌患者における, CAM 投与の延命効果はサイトカイン産生パターンを Th 1 優位に導いて癌に対する免疫能を亢進させることが一因と考えられた.

したがって CAM は tumor dormancy therapy として有用な薬剤であると考えられた.

結 論

マクロライド系抗菌薬の作用は多様であり, 元来有している抗菌作用以外に様々な作用を有している.

本研究では CAM は非小細胞肺癌に転移抑制効果と宿主の免疫を制御する可能性を示した. CAM の転移抑制効果は, 腫瘍細胞が発現する integrin の発現抑制に基くと考えられた. また CAM による腫瘍細胞の TGF- β 産生抑制は, 腫瘍組織内血管新生や腫瘍周囲線維化を抑制し腫瘍の進展を抑制すると同時に, TGF- β による宿主免疫抑制の回避に役立っている可能性が示唆された.

宿主に対しては, CAM が担癌状態でのサイトカイン産生パターンを Th 1 優位に導くことが示され, 宿主免疫を細胞性免疫優位に導くことで, 予後の改善をもたらしている可能性が推察された.

以上から, 本研究は CAM が非小細胞肺癌細胞に直接かつ免疫調節作用を介して, 予後を改善するという新しい知見を提示した.

なお, 本論文の要旨の一部は第 46 回日本化学療法学会総会(1998年6月, 和歌山), 第 47 回日本化学療法学会総会(1999年6月, 東京), 第 48 回日本化学療法学会総会(2000年6月, 岡山), 第 39 回日本肺癌学会(1998年10月, 金沢), 第 40 回日本肺癌学会(1999年10月, 札幌), 第 39 回日本呼吸器学会総会(1999年3月, 横浜), 第 40 回日本呼吸器学会総会(2000年3月, 広島), 第 57 回日本肺癌学会総会(1998年10月, 横浜), 第 58 回日本癌学会総

会(1999年10月, 広島), 第 4 回国際マクロライド学会(1998年1月, バルセロナ, スペイン), 第 5 回国際マクロライド学会(2000年1月, セビア, スペイン), 第 21 回国際化学療法学会(1999年7月, バーミンガム, イギリス), 第 9 回世界肺癌学会(2000年9月, 東京)で発表した.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました奈良県立医科大学第 2 内科学教室成田亘啓教授, 細菌学教室喜多英二教授に深甚なる謝意を捧げると共に, 御校閲, 御助言を賜りました腫瘍病理学教室小西陽一教授に深謝申し上げます. さらに研究の遂行について終始ご指導を頂いた三笠桂一講師, 坂本正洋助手に深謝いたします. また, 日々御協力頂いた第 2 内科学教室・細菌学教室の諸兄姉に感謝いたします.

文 献

- 1) 澤木政好・三上理一郎・三笠桂一・国松幹和・伊藤新作・成田亘啓: 慢性下気道感染症における Erythromycin 長期化学療法法の検討—第一報: Amoxicillin との対比—. 感染症誌. 60: 37-44, 1986.
- 2) Kita, E., Sawaki, M., Nishikawa, F., Mikasa, K., Yagyu, Y., Takeuchi, S., Yasui, K., Narita, N. and Kashiba, S.: Enhanced interleukin production after long-term administration of erythromycin stearate. Pharmacol. 41: 177-183, 1990.
- 3) 前田光一・澤木政好・喜多英二・三笠桂一・古西満・寺本正治・森 啓・坂本正洋・辻本正之・竹内章治・濱田 薫・国松幹和・成田亘啓: 慢性下気道感染症におけるマクロライド薬投与によるサイトカインの変動. 日治療会誌. 43: 825-829, 1997.
- 4) Kita, E., Sawaki, M., Oku, D., Hamuro, A., Mikasa, K., Konishi, M., Emoto, M., Takeuchi, S., Narita, N. and Kashiba, S.: Suppression of virulence factors of pseudomonas aeruginosa by erythromycin. J. antimicro. chemotherapy 27: 273-284, 1991.
- 5) 澤木政好・三笠桂一・古西 満・前田光一・成田亘啓: 慢性下気道感染症における erythromycin 長期治療に関する臨床的研究. 日治療会誌. 46: 239-247, 1998.
- 6) 三笠桂一・澤木政好・喜多英二・古西 満・前田光一・濱田 薫・竹内章治・増谷喬之・佐野麗子・国松幹和・櫻葉周三・成田亘啓: 慢性下気道感染症に

- における Erythromycin (EM) 長期化学療法 の 検 討 第 4 報 : EM 無 効 例 対 する clarithromycin の 有 効 性 について . 感 染 症 誌 . 66 : 1097-1104, 1992.
- 7) **Anderson, R.** : Erythromycin and roxithromycin potentiate human neutrophil locomotion in vitro by inhibition of leukoattractant-activated superoxide generation and autooxidation. *J. Infectious Dis.* **159** : 966-973, 1989.
 - 8) **Fraschini, F., Scaglione, F., Ferrara, O., Braga, P. C. and Teodori, F.** : Evaluation of the immunostimulating activity of erythromycin in man. *Chemotherapy* **32** : 286-290, 1986.
 - 9) **Hamada, K., Kita E., Sawaki M., Mikasa K. and Narita N.** : Antitumor effect of erythromycin in mice. *Chemother.* **41** : 59-69, 1995.
 - 10) **Mikasa, K., Sawaki, M., Kita, E., Hamada, K., Teramoto, S., Sakamoto, M., Maeda, K., Konishi, M. and Narita, N.** : Significant survival benefit to patients with advanced non-small cell lung cancer from treatment with clarithromycin. *Chemother.* **43** : 288-296, 1997.
 - 11) 寺本正治・喜多英二・三笠桂一・濱田 薫・古西 満・前田光一・坂本正洋・辻本正之・森 啓・澤木政好 : Clarithromycin 投与非小細胞肺癌患者末梢血単核球における interleukin-12 mRNA の発現 . 日化療会誌 . 45 : 144-147, 1997.
 - 12) **Morino, P., Pampallona, S., Preatoni, A., Cantoni, A. and Invernizzi, F.** : Chemotherapy vs supportive care in advanced non-small cell lung cancer. *Chest* **106** : 861-865, 1994.
 - 13) **Souquet, P. J., Chanvin, F., Boissel, J. P., Cellerino, R., Cormier, Y., Ganz, P. A., Kaasa, S., Pater, J. L., Qouix, E., Rapp, E., Tumarello, D., Williams, J., Woods, B. L. and Bernard, J. P.** : Polychemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Lancet* **342** : 19-21, 1993.
 - 14) 漆崎一朗 : 癌のドーマンシー・セラピーとは . 外科治療 . 81 : 625-626, 1999.
 - 15) **Holmgren, L., O'reilly, M, S., and Folkman, J.** : Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat. Med.* **1** : 149-153, 1995.
 - 16) **Liotta, L. A., Rao, C. N., and Wewer, U. M.** : Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Ann. Rev. Biochem.* **55** : 1037-1057, 1986.
 - 17) **Liotta, L. A.** : Cancer cell invasion and metastasis. *Sci. Am.* **266** : 54-63, 1992.
 - 18) **Hynes, R. O.** : Integrins : versatility, modulation, signaling in cell adhesion. *Cell* **69** : 11-25, 1992.
 - 19) **Helmer, M. E.** : VLA proteins in the integrin family : structures, functions and their role on leukocytes. *Ann. Rev. Immunol.*, **8** : 365-400, 1990.
 - 20) **Chan, B. M. C., Matsubara, N., Takada, Y., Zetter, B. R. and Hemler, M. E.** : In vitro and in vivo consequences of VL A-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. *Science* **251** : 1600-1602, 1991.
 - 21) **Matsuura, N., McLaughlin, W. P., Irie, A., Morikawa, Y., Kakudo, K. and Takada, Y.** : Induction of experimental bone metastasis in mice by transfection of integrin $\alpha 4 \beta 1$ into tumor cells. *Am. J. Pathol.* **148** : 55-61, 1996.
 - 22) **Elices, M. J., Osborn, L., Takeda, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M. E., and Lobb, R. R.** : VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocytes integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* **60** : 577-584, 1990.
 - 23) **Hemler, M. E., Elices, M. J., Parker, C. and Takeda, Y.** : Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell matrix adhesion functions. *Immunol. Rev.* **114**. 45-65, 1990.
 - 24) **Shimizu, Y., Seventer, G. A. V., Horgean, K. J. and Shaw, S.** : Regulated expression and binding three VLA (bata-1) integrin receptors on T cells. *Nature* **345** : 250-253, 1990.
 - 25) **Martin-Padura, I., Mortarni, R., Lauri, D., Berasconi, S., Sanchez-Madrid, F., Parmiani, G., Mantovani, A., Anichini, A. and Dejana, E.** : Heterogeneity in human melanoma cell adhesion to cytokine activated endothelial cells correlates with VLA-4 expression. *Cancer Res.* **51** : 2239-2241, 1991.
 - 26) **Ramos, D. M., Berston, E. D. and Kramer R. H.** : Analysis of integrin receptors for laminin and type IV collagen on metastatic B16 melanoma cells. *Cancer Res.* **50** : 728-734, 1990.
 - 27) **Sonnenberg, A., Modderman, P. W. and Hogervorst, F.** : Laminin receptor on platelets is

- the integrin VLA-6. *Nature* **336**: 487-489, 1988.
- 28) **Norgaard, P., Hougaard, S., Poulsen, H. S. and Spang-Thomsen, M.** : Transforming growth factor and cancer. *Cancer Treat. Rev.* **21**: 367-403, 1995.
- 29) **Occleston, N. L. and Walker, C.** : Production of multiple growth factor by human non-small cell lung carcinoma cell line. *Cancer Lett.* **71**: 203-210, 1990.
- 30) **Berg, J.** : The expression of the platelet-derived and transforming growth factor genes in human non-small cell lung cancer cell lines is related to tumor stroma formation in nude mice tumor. *Am. J. Pathol.* **133**: 434-439, 1988.
- 31) **Raychundry, A., Frazier, W. A. and Amore, P. A.** : Comparison of normal and tumorigenic endothelial cells: Differences in thrombospondin production and responses to transforming growth factor-beta. *J. Cell. Sci.* **107**: 39-46, 1994.
- 32) **Yang, E. Y. and Moses, H. L.** : Transforming growth factor β 1-induced changes in cell migration, proliferation and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J. Cell. Biol.* **111**: 731-741, 1990.
- 33) **Arteaga, C. L., Hurd, S. D., Winnier, A. R., Johnson, M. D., Fendly, B. M. and Forbes, J. T.** : Anti-Transforming growth factor (TGF)- β antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. *J. Clin. Invest.* **92**: 2569-2576, 1993.
- 34) **Vekia, N., Ohkawa, T., Yokohama, Y., Maeda, J., Kawai, Y., Ikeda, T., Amuro, Y., Hada, T. and Higashino, K.** : Potentiation of metastatic capacity by transforming growth factor- β 1 gene transfection. *Jpn. J. Cancer Res.* **84**: 589-593, 1993.
- 35) **Li, Xi. F., Takiuchi, H., Zou, J. P., Katkgiri, T., Yamamoto, N., Nagatu, T., Ono, S., Fujiwara, H. and Hamaoka, T.** : Transforming growth factor- β (TGF- β)-mediated immunosuppression in the tumor bearing state: Enhanced production of TGF- β and a progressive increase in TGF- β susceptibility of anti-tumor CD 4+ T cell function. *Jpn. J. Cancer Res.* **84**: 315-325, 1993.
- 36) **Torre-Amione, G., Beauchamp, D. R., Koeppen, H., Park, B. H., Schreiber, H., Mouses, H. D. and Rowley, D. A.** : A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type β 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**: 1486-1490, 1990.
- 37) **Zou, J. P., Shimizu, J., Ikegami, K., Yamamoto, N., Ono, S., Fujiwara, H. and Hamaoka, T.** : Tumor bearing mice exhibit a progressive increase in tumor antigen presenting cell function and a reciprocal decrease in tumor antigen-response CD4+ T cell activity. *J. Immunol.* **148**: 648-655, 1992.
- 38) **Yamamoto, N., Zou, J. P., Li, X. F., Takenaka, H., Noda, S., Fujii, T., Ono, S., Kobayashi, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Fujiwara, H. and Hamaoka, T.** : Regulatory Mechanisms for production of IFN-gamma and TNF by antitumor T cell or macrophages in the tumor bearing state. *J. Immunol.* **154**: 2281-2290, 1995.
- 39) **Brunda, M. J., Luistro, L., Warriar, R. R., Wright, R. B., Hubbard, B. R., Murphy, M., Wolf, S. F. and Gately, M. K.** : Antitumor and antimetastatic activity of Interleukin 12 against Murine tumors. *J. Exp. Med.* **178**: 1223-1230, 1993.
- 40) **Nastala, C. L., Edington, H. D., McKinney, T. G., Tahara, H., Nalesnik, M. A., Brunda, M. J., Gately, M. K., Wolf, S. F., Schreiber, R. D., Storkus, W. J. and Lotze, M. T.** : Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J. Immunol.* **153**: 1697-1706, 1994.
- 41) **Strassmann G, Fong M, Kenny J. S. and Jacob, C. O.** : Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J. Clin. Invest.* **89**: 1681-1684, 1992.
- 42) **Strassmann, G., Jacob, C. D., Evans, R., Beall, D. and Fong, M.** : Mechanisms of experimental cancer cachexia. Interaction between mononuclear phagocytes and colon-26 carcinoma and its relevance to IL-6-mediated cancer cachexia. *J. Immunol.* **148**: 3674-3678, 1992.
- 43) **Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J. D., Mathison, J., Ulevitch, R. and Carami, A.** : Identity of tumor necrosis factor and the macro-

- phage-secreted factor cachectin. *Nature* **316** : 552-554, 1985.
- 44) **D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Nicholas, M., Ma, V. X., Kubin, M. and Trinchieri, G.** : Interleukin 10(IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* **178** : 1041-1048, 1993.