



Title	In vitro X線照射によるNK活性の変動とOK-432によるNK活性増強作用について
Author(s)	根住, 直史; 小西, 淳二; 御前, 隆 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1985, 45(5), p. 752-763
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/16031
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

In vitro X線照射によるNK活性の変動とOK-432による NK活性増強作用について

関西電力病院内科

根住直史

京都大学医学部放射線核医学科

小西 淳二 御前 隆 小野 公二
阿部 光幸 鳥塚 荘爾

（昭和59年10月1日受付）

（昭和59年12月15日最終原稿受付）

In Vitro Effects of X-irradiation on NK Activity and Its Augmentation by OK-432 Treatment

Naofumi Nesumi

Department of Internal Medicine, Kansai Denryoku Hospital

Junji Konishi, Takashi Misaki, Koji Ono, Mitsuyuki Abe
and Kanji Torizuka

Department of Radiology and Nuclear Medicine, Kyoto University School of Medicine

Research Code No. : 405.9

Key Words : Natural killer activity, Radiation, OK-432, Interferon, Interleukin-2

We studied effects of X-irradiation on NK activity of human peripheral mononuclear (PMN) cells in vitro and analyzed the influences of irradiation on augmentation of NK activity by OK-432 and two lymphokines (Interferon and Interleukin-2).

Dose dependent decrease in NK activity was observed 24 hours after irradiation (4—30 Gy), and the decrease was more marked after 72 hours. Remaining NK activity of cells irradiated with 8 Gy was $78.1 \pm 16.1\%$ after 24 hours, and $5.5 \pm 3.5\%$ after 72 hours.

NK activity of PMN cells irradiated with different doses (4—16 Gy) was augmented by OK-432 treatment for 24 hours immediately after irradiation, as was observed in non-irradiated PMN cells. Augmentation indicies (1.78 ± 0.48 — 2.35 ± 1.03) were similar to those observed in non-irradiated cell. Such an augmentation of NK activity was also obtained by treatment with IFN or IL-2.

Treatment with Ok-432 of irradiated PMN cells for 72 hours strikingly prevented the decrease of NK activity. Thus, after 2 Gy irradiation, remaining NK activity of PMN cells incubated with OK-432 was $82.0 \pm 16.0\%$, while that of cells incubated with medium alone was $34.9 \pm 12.2\%$. Such an protective effect at 72 hours was similarly seen, when irradiated PMN cells was treated by IL-2, but not seen when treated by IFN.

When NK activity of PMN cells was augmented by OK-432 or IFN, and irradiated thereafter, remaining NK activity of augmented PMN cells 24 hours after irradiation was not significantly different from that of non-augmented PMN cells. Those results indicated that both augmented and non-

augmented NK cells have similar radiosensitivity.

These *in vitro* studies suggest possible beneficial effects of OK-432 in patients undergoing radiotherapy.

緒 言

悪性腫瘍に対する免疫監視(immunosurveillance)を担う細胞として、腫瘍細胞に対する特異的障害作用を持つ Cytotoxic T 細胞(CTL)¹⁾について多くの研究がなされているが、一方、腫瘍細胞に対して非特異的障害作用を示すリンパ球の存在も明らかにされている。すなわち、Natural killer (NK) 細胞はヒト、マウス、ラットなどに存在する、抗原や mitogen の刺激なしで“自然に”異種、同種、あるいは同系細胞に対して障害作用を持つ未感作リンパ球であり、CTLとともに発癌や腫瘍の増殖に対する免疫監視において重要な役割を果していると考えられ²⁾³⁾、主に *in vitro* において検討がなされている。著者らは先に、悪性腫瘍患者末梢血リンパ球の NK 活性について検討を行い、放射線治療に際してその活性が著しく低下することを認めている⁴⁾。このことは悪性腫瘍の再発や転移の防止と云う観点から臨床的にも見逃すことのできない問題と考えられる。

一方、悪性腫瘍患者に対して手術、放射線治療、および化学療法のほか、近年非特異的免疫療法が行われることが多くなっており⁵⁾⁶⁾、この際に用いられる代表的薬剤の一つである OK-432 は NK 活性を増強させることができることが知られている。

そこで、著者らは放射線治療における非特異的免疫療法併用の意義を明らかにする為の基礎的検討として、*in vitro* X 線照射によるヒト末梢単核球の NK 活性の変動および OK-432 の NK 活性増強作用に対する X 線照射の影響を検討した。更に OK-432 の作用機序を明らかにする為に、NK 活性増強作用を持つ lymphokine である Interferon (IFN) および Interleukin-2 (IL-2) について、OK-432 との比較検討を行ったのでその成績を報告する。

材料および方法

1) 使用薬剤

a) OK-432 (Picibanil) : OK-432 は A 群 3 型溶

連菌 Sv 株の弱毒変異株 (Su 株) をペニシリン処理して凍結乾燥された粉末で、RPMI 1640 に懸濁して用いた。

b) Interferon (IFN) : 健康なヒト新生男児包皮由来の正常二倍体線維芽細胞より產生された IFN- β (MR-21、持田製薬) を用いた。比活性は 1×10^7 IU/mg protein 以上であり、RPMI 1640 に溶解して用いた。

c) Interleukin-2 (IL-2) : Phytohemagglutinin および IFN- γ を含まない高純度の IL-2 (ENI, CAT. No. ENI-IL-2-10) を用いた。T 細胞培養に際して、RPMI 1640 に牛胎児血清 (10~20%) とこの IL-2 (10%) を添加すると T 細胞は 2~5 日ごとに 2~3 倍の増殖がみられるとしている。

2) 実験方法

a) 対象 : 24~38 歳の健康人男性および女性延べ 10 名の末梢単核球を実験対象とした。

b) 末梢単核球の分離 : ヘパリン加末梢血より Ficoll-Conray 法にて単核球を分離した。単核球は Hanks 液にて 3 回洗滌後、10% 牛胎児血清添加 RPMI 1640 にて 1×10^6 /ml または 2×10^6 /ml の濃度に調製した。

c) 末梢単核球に対する X 線照射 : 照射は水槽中に静置したプラスチックチューブ内の末梢単核球浮遊液 (1×10^6 /ml または 2×10^6 /ml) に対して、Linac X 線 (10MeV, STD=100cm, 線量率 2Gy/min.) を用いて、室温にて行った。

d) 末梢単核球に対する薬剤処理 : 照射または非照射末梢単核球浮遊液に対して、使用薬剤を適当な濃度となるように添加し、37°C, 5% CO₂ にて定められた時間培養した。

e) NK 活性の測定法 : 押味ら⁷⁾の方法に準じて行った。各種の処理を受けた培養中の末梢単核球を Hanks 液で洗滌後、洗滌前と同量の 10% 牛胎児血清添加 RPMI 1640 に再浮遊させ effector 細胞とした。target 細胞は、赤白血病由来株化細胞

K-562 1×10^6 コを $100\mu\text{ci}$ の $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ （ミドリ十字）で90分間標識後3回洗滌し、10%牛胎児血清添加RPMI 1640に $2.5 \times 10^5/\text{ml}$ 濃度に浮遊させて調製した。effector細胞 $100\mu\text{l}$, target細胞 $40\mu\text{l}$ をtriplicateでmicroculture plate (Limbro, CAT. No. 76-031-05) の各wellに加えて混和し(E:T=10:1または20:1), 5%CO₂, 37°Cにて3.5時間培養した後, Titertek supernatant collection systemにて上清を採取し, ^{51}Cr 放出値をカウントした。 $\%$ 特異的 ^{51}Cr 放出値は次式で算出し, これをNK活性とした。

$$\% \text{ 特異的}^{51}\text{Cr} \text{ 放出値} =$$

$$\frac{\text{Experimental } ^{51}\text{Cr release}}{\text{Maximum } ^{51}\text{Cr release}} \times 100 (\%)$$

$$= \frac{\text{Experimental } ^{51}\text{Cr release}}{\text{Spontaneous } ^{51}\text{Cr release}} \times 100 (\%)$$

Experimental ^{51}Cr releaseは, effector細胞とtarget細胞を混和して培養した場合の, Spontaneous ^{51}Cr releaseは, 10%牛胎児血清添加RPMI 1640を加えたtarget細胞単独培養時の, Maximum ^{51}Cr releaseは, 1% sodium dodecyl sulfateを加えたtarget細胞培養時のそれぞれの ^{51}Cr 放出値を示す。

f) NK活性残存率 (Remaining NK activity) : 各種の条件下におけるNK活性におよぼすX線照射の影響を知る為に, 被照射末梢単核球のNK活性と, 同一培養条件の非照射末梢単核球のNK活性とを次式によって比較し, Remaining NK activityを算出し, その変動を検討した。

$$\% \text{ Remaining NK activity} =$$

$$= \frac{\text{被照射単核球 NK 活性}}{\text{非照射単核球 NK 活性}} \times 100 (\%)$$

g) 推計学的検討: 各種の実験によって得られた結果の有意差検定は, Studentのt検定によって行い, 危険率5%以下をもって有意差があるとした。

結 果

1) X線照射によるNK活性の変動

4名の末梢単核球に30Gyまでの種々の線量のX線照射を行い, 経時的にNK活性の変動を調べた。同一の線量を受けた末梢単核球においても, 測定までの培養時間によってNK活性は大きな

変動を示した(Fig. 1)。特に8Gyの照射後0時間および2時間後に測定すると, Remaining NK activityはそれぞれ $111.9 \pm 9.1\%$ (平均値±S.D.), $122.0 \pm 16.5\%$ と照射を行わない場合に比較してむしろ上昇の傾向を示し, その後24時間後には $80.1 \pm 9.2\%$ と低下した。しかしながら, 16Gyの照射後にはこのような上昇は認められず, 30Gyでは0および2時間後にもそれぞれ $20.5 \pm 4.4\%$, $32.8 \pm 6.3\%$ と著明に低下した。さらに例数を増やして24時間後および72時間後のRemaining NK activityを検討すると, 24時間後には線量依存性の低下を示し, 72時間後では低線量においても著明な低下を示した(Fig. 2)。

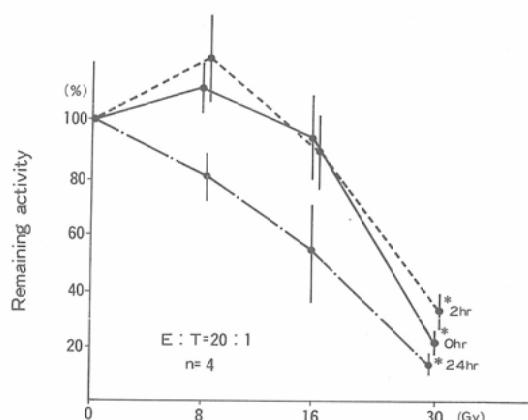


Fig. 1 Percent remaining NK activity at different times after irradiation. Results are means (\pm S.D.) of four experiments. *significantly lower than non-irradiated cells ($p < 0.01$).

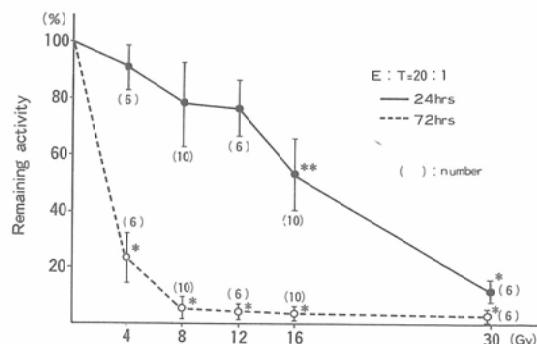


Fig. 2 Percent remaining NK activity at 24 and 72 hrs after irradiation. *, ** significantly lower than non-irradiated cells (* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$).

2) Erythrocine B exclusion 法による X 線照射後の末梢単核球生存率 (Fig. 3)

4名の $2 \times 10^6/\text{ml}$ 濃度の末梢単核球に、種々の線量のX線照射を行い、0.2% erythrocine B液(和光純薬)にてviabilityを検討した。非照射にて24時間培養後の生細胞数を100%として表わすと、照射後24時間では16Gy以上にてやや低下の傾向を認めたが、16Gyでも $92.5 \pm 5.2\%$ と高い生存率を示した。しかしながら、72時間経過すると2Gyにて $62.3 \pm 7.4\%$ と著明な低下を示し、16Gyでは $46.4 \pm 7.0\%$ と更に低下した。

3) OK-432のNK活性増強効果 (Fig. 4)

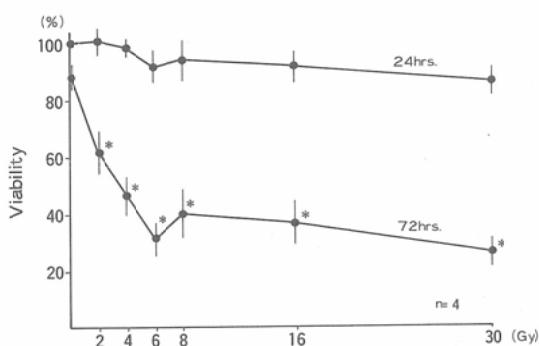


Fig. 3 Changes in viability of peripheral mononuclear cells after irradiation measured by Erythrocine B dye exclusion method. Results are means ($\pm \text{S.D.}$) of four experiments. *significantly lower than non-irradiated cells ($p < 0.01$).

種々の濃度のOK-432を培養液中に添加しそのNK活性に対する影響を検討した。24時間培養後には、OK-432最終濃度 $10^{-2} \sim 10^{-1}\text{KE/ml}$ で濃度依存性に著明なNK活性の増強効果を認めた。このため、以後の実験は 10^{-1}KE/ml の濃度で行った。OK-432を 10^{-1}KE/ml 添加し、24時間および72時間培養後のNK活性は、それぞれOK-432非添加の場合に比較して 1.7 ± 0.5 倍、 2.0 ± 0.5 倍の増強を示した($n=8$)。一方K562細胞をOK-432添加培養液にて3.5時間培養後、放出された ^{51}Cr を測定したが、OK-432非添加培養液にて培養した場合と有意な差はみられず、OK-432による直接の細胞障害作用はないと考えられた。

4) 被照射末梢単核球のNK活性に対するOK-432の影響

4名の末梢単核球に30Gyまでの種々の線量のX線照射を行った後、OK-432添加または非添加にて培養した。24時間および72時間後のNK活性は、それぞれTable 1に示す如くで、24時間後にはOK-432添加によって8および16Gyでそれぞれ平均2.2倍、2.4倍と、ほぼ非照射群と同程度の増強効果を認めた。30Gyでは非添加群の高度のNK活性の低下を反映し大きな動搖を示した。72時間後には、非添加の場合に各線量でNK活性は2.5%以下と極めて低値を示したが、OK-432添加にて培養した場合は8~16Gyで $44.7 \sim 12.8\%$ とNK活性の著明な増強がみられた。OK-432添加群のRemaining NK activityは9~72%と非添加群の3~4%に比して著しく高く、8~16Gyの照射後にも添加群では非照射時に近いNK活性が保持されていた。そこで、16Gyのほか2~8Gyの低線量について照射72時間後のNK活性に対するOK-432添加の影響を検討した(Fig. 5)。2Gyの照射後、OK-432非添加時のRemaining NK activityは $34.9 \pm 12.2\%$ で低線量においても著明な低下がみられたが、OK-432添加時には $82.0 \pm 16.4\%$ と有意に高値を保ち($p < 0.01$)、他の線量においても同様であった。NK活性の絶対値においても、添加群では8~16Gy照射まで非添加の非照射群より高値を示した。

5) OK-432をX線照射48時間後に添加した場

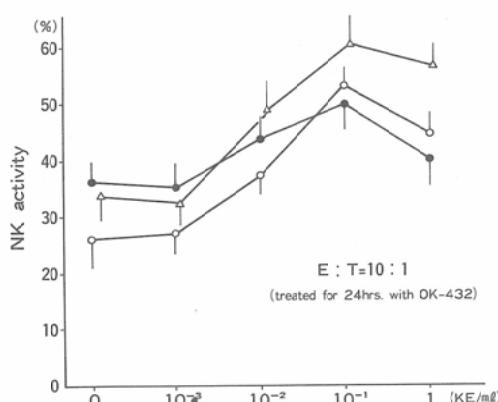


Fig. 4 Augmentation of NK activity by OK-432 treatment. Values are means ($\pm \text{S.D.}$) of triplicate determination using PMN cells from 3 healthy subjects (●, △, ○).

Table 1 Augmentation of NK activity by OK-432 treatment for 24 and 72 hrs after irradiation (E : T=20 : 1). 1) mean of the calculated augmentation index in PMN cells. 2) mean of the calculated remaining NK activity in PMN cells.

Dose of X-ray	A		B		C		D		¹⁾ Augmentation Index OK-432 (+)/(-)
	OK-432 (-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	
after 24 hrs.									
0 Gy	27.4	40.2	20.6	49.0	28.4	37.7	26.9	39.6	1.78±0.48
8	24.2	54.0	12.8	31.6	17.4	32.3	16.2	37.1	2.21±0.26
16	18.2	32.8	7.8	15.8	13.1	22.4	9.2	35.9	2.35±1.03
30	1.2	8.4	3.6	9.8	2.0	10.1	1.0	10.5	6.33±3.29
after 72 hrs.									²⁾ Remaining Activity (%)
0 Gy	27.6	54.5	18.1	52.4	39.8	55.5	27.3	56.8	100 100
8	1.1	44.7	0	34.9	2.5	35.6	0.8	42.0	3.3±2.6 71.6±8.1
16	0	31.6	1.6	16.4	2.0	12.8	0	24.5	3.5±4.3 38.9±15.2
30	0	7.2	2.5	6.3	0	0.6	0	4.5	3.5±7.0 8.5±5.5

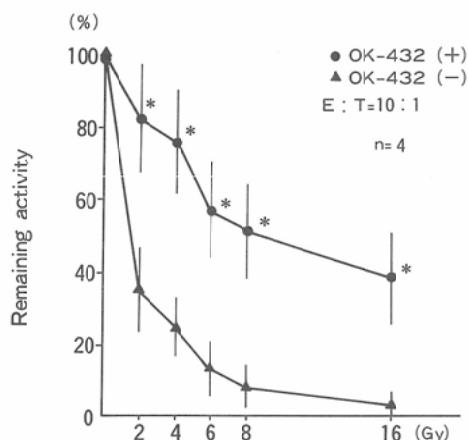


Fig. 5 Augmentation of NK activity by OK-432 treatment for 72 hrs after irradiation. Results are mean (\pm S.D.) of four experiments. *significantly higher than the remaining activity of corresponding non-treated cells ($p < 0.01$).

合のNK活性に対する影響

OK-432のNK活性増強効果は、Table 1に示すように24時間の処理で発現すると考えられた。このため、4名の末梢単核球に対し、8Gyまたは16GyのX線照射を行った後、直後または48時間培養後にOK-432を添加し、照射72時間後にNK

活性を測定した。Table 2に示すように、照射48時間後にOK-432を添加した場合は、照射直後にOK-432を添加した場合に比較してNK活性の低下が高度であり、Remaining NK activityの平均値をみると8および16Gyの照射でそれぞれ両群間に有意の差が認められた。なお、OK-432を48時間後に添加した場合と非添加の場合とを比較すると、Remaining NK activityの平均値は有意ではないが高値の傾向を示した。

6) OK-432によって増強されたNK活性に対するX線照射の影響

4名の末梢単核球をOK-432添加培養液中で24時間培養しNK活性を増強させた後、30Gyまでの種々の線量のX線を照射した。照射後OK-432非添加培養液にて、24時間または48時間培養後にNK活性を測定し、Remaining NK activityを算出した。Fig. 6に示すように、24時間後に測定を行うと、OK-432によるNK活性の増強の有無にかかわらず、Remaining NK activityは線量依存性に同様に低下した。ところが、48時間後に測定を行うと、OK-432非処理の場合は4Gy照射によって著明なRemaining NK activityの低下がみられたのに対して、OK-432にて処理された場合の低下

Table 2 Comparison of NK activity of PMN cells treated by OK-432 at 0 and 48 hrs after irradiation. Assay was performed at 72 hrs after irradiation (E : T = 10 : 1). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. 1) mean of the calculated remaining NK activity in PMN cells.

Dose of X-ray	NK activity (%)				① Remaining activity (%)										
	A		B		C		D								
	OK-432	(-) 48hrs 0 hr	(-) 48hrs 0 hr	(-) 48hrs 0 hr											
0 Gy	25.7	35.7	45.9	20.0	30.9	42.9	28.6	35.7	42.9	29.5	31.8	45.9			
8	1.9	6.6	28.6	2.7	3.7	35.1	5.7	7.8	26.4	6.9	18.3	31.4	16.0±7.0	27.5±20.4	68.5±9.4
16	0.3	2.7	24.3	1.5	4.0	26.2	2.5	2.6	10.4	1.8	6.3	19.2	5.6±3.8	12.0±5.9	45.0±16.0

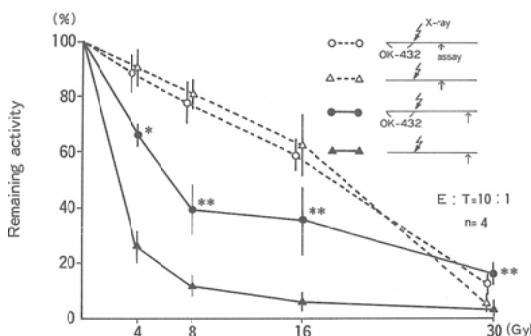


Fig. 6 Percent remaining augmented NK activity after irradiation. OK-432 treatment was performed for 24 hrs before irradiation. *, **significantly higher than the remaining activity of corresponding cells at 48 hrs after irradiation (* $p < 0.001$, ** $p < 0.05$).

は有意に軽度であり($p < 0.001$),他の線量においても同様であった。NK活性の絶対値においても,OK-432処理群では4Gy照射で、非処理の非照射群より高値であった。

7) IFN- β の NK 活性増強効果

IFN- β を培養液中に添加し、末梢単核球のNK活性に対する影響を検討した。24時間後にNK活性を測定すると、IFN- β 最終濃度1,000~4,000U/mlで濃度依存性に著明な増強効果が認められた(Fig. 7A)。このため、以後の実験は2,000U/mlの濃度で行った。IFN- β による処理時間とNK活性との関係を検討すると、30分間ですべて非添加群に比較して明らかな上昇がみられ、2時間以上ではほぼ一定となり約1.8倍の増強効果が認められ

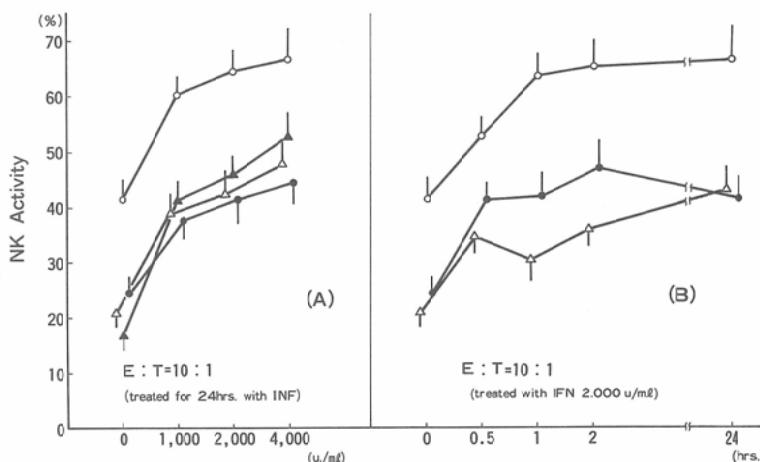


Fig. 7 Augmentation of NK activity by IFN- β treatment. Values are means (\pm S.D.) of triplicate determination using PMN cells from 4 healthy subjects (○, ●, △, ▲).

た(Fig. 7B)。一方、K562細胞をIFN- β 添加培養液にて3.5時間培養しただけでは有意な細胞障害作用は認められなかった。

8) 被照射末梢単核球のNK活性に対するIFN- β の影響

4名の末梢単核球に16Gyまでの種々の線量のX線照射を行った後、IFN- β 添加または、非添加にて24時間培養しNK活性を測定した。各線量群においてTable 3に示すように、IFN- β 添加によりNK活性の増強が認められた。各線量におけるAugmentation Indexの平均値は 1.65 ± 0.23 ～ 2.23 ± 0.69 で各線量間に有意差は認められなかつた。

9) IFN- β によって増強されたNK活性に対するX線照射の影響

4名の末梢単核球をIFN- β 添加培養液中で2時間培養しNK活性を増強させた後、16Gyまで

の種々の線量のX線を照射した。その後IFN- β 非添加培養液にて24時間培養した後NK活性を測定すると、Table 4に示すようにIFN- β 非処理の対照と同様に線量依存性にNK活性の低下が認められた。各例についてRemaining NK activityを算出し、4例をまとめて比較すると、各線量においてIFN- β 処理群と非処理群の間に有意差は認めず同様の放射線感受性を示した。

10) 照射後のNK活性に対するOK-432とIFN- β の影響の比較

4名の末梢単核球に対して8GyのX線照射を行い、OK-432またはIFN- β を添加して培養、24時間および72時間後にNK活性を測定した。Table 5に示すように、24時間後のNK活性の比はOK-432:IFN- β =1:0.91±0.03とほぼ同程度の増強を示したが、72時間後には1:0.41±0.10となりOK-432による増強効果が有意に高度であった($p<0.001$)。

11) IL-2のNK活性増強効果(Fig. 8)

種々の濃度のIL-2を培養液中に添加し、そのNK活性に対する影響を検討した。24時間後には、IL-2最終濃度2～20%vol.で濃度依存性に著明なNK活性の増強効果を認めた。このため、以後の実験は10%vol.の濃度で行った。一方、K562細胞をIL-2添加培養液にて3.5時間培養しただけでは有意な細胞障害作用は認められなかつた。

12) 被照射末梢単核球のNK活性に対するIL-2の影響

4名の末梢単核球に30Gyまでの種々の線量の

Table 3 Augmentation of NK activity by IFN- β treatment for 24 hrs after irradiation (E:T=10:1). 1) mean of the calculated augmentation index in PMN cells.

Dose of X-ray	NK activity (%)								¹⁾ Augmentation Index IFN(+)/(-)	
	A		B		C		D			
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)		
0 Gy	32.5	50.0	33.1	52.4	31.5	47.2	17.7	35.2	1.65 ± 0.23	
4	33.6	48.1	23.9	51.3	32.2	38.6	15.6	31.2	1.70 ± 0.45	
8	23.3	44.0	15.3	48.9	31.4	38.0	14.8	25.2	2.00 ± 0.84	
12	28.1	38.7	15.5	49.8	27.5	37.6	13.9	21.3	1.89 ± 0.89	
16	18.4	38.3	13.6	46.1	16.5	25.7	8.3	15.9	2.23 ± 0.69	

Table 4 Effects of irradiation on the NK activity augmented by treatment with IFN- β for 2 hrs (E:T=10:1). NK activity was assayed 24 hrs after irradiation. 1) mean of the calculated remaining NK activity in PMN cells.

Dose of X-ray	NK activity (%)								¹⁾ Remaining Activity (%)	
	A		B		C		D			
	Augmentation (-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
0 Gy	25.2	50.7	25.9	55.0	29.5	51.4	34.2	58.4	100	100
4	21.9	36.5	22.6	47.5	28.6	46.5	30.4	50.1	90.0 ± 4.7	83.6 ± 8.1
8	16.6	30.1	20.7	42.6	24.5	40.1	29.5	47.6	78.8 ± 9.0	74.1 ± 10.0
12	15.5	36.5	21.7	35.1	25.2	37.4	17.6	35.5	70.5 ± 16.7	67.3 ± 6.0
16	16.0	32.9	16.9	32.6	18.6	34.3	15.5	32.4	59.3 ± 9.4	61.6 ± 5.1

Table 5 Augmentation of NK activity by IFN- β or OK-432 treatment at 24 and 72 hrs after 8 Gy irradiation (E : T=20 : 1). (-) : medium alone. *p<0.01.

Case No.	24 hrs.				72 hrs.			
	NK activity (%)				NK activity (%)			
	(-)	IFN	OK-432	IFN OK-432	(-)	IFN	OK-432	IFN OK-432
1	31.5	57.4	62.9	0.91	2.1	10.8	20.0	0.54
2	36.8	61.2	69.6	0.88	1.4	10.3	31.8	0.32
3	34.5	56.5	60.6	0.93	2.4	14.5	32.5	0.44
4	29.6	55.5	58.2	0.95	2.9	12.3	36.5	0.34
mean \pm S.D.	0.91 \pm 0.03*				0.41 \pm 0.10*			

X線照射を行った後、IL-2 添加または非添加にて培養した。24時間および72時間後のNK活性は、それぞれTable 6に示す如くで24時間後にはIL-2添加によって、0~16Gyで1.60~2.15倍と各線量においてほぼ同程度の増強効果を認めた。NK活性の絶対値においても、IL-2添加群では8~16Gy照射まで非添加の非照射群と同じ、またはより強い活性が認められた。また72時間後にはIL-2添加によって、8~16GyでNK活性の低下は著明に軽減され、OK-432添加の際に認められた効果とほぼ同等の増強がみられた。例えは、8Gy照射時にIL-2またはOK-432を添加した場合のRemaining

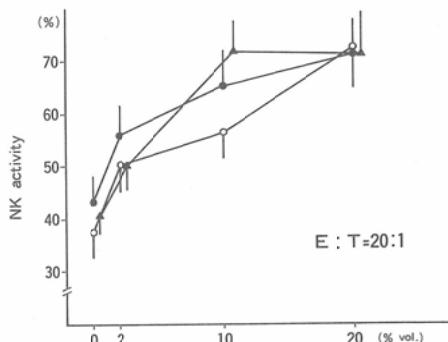


Fig. 8 Augmentation of NK activity by IL-2 treatment. Values are means (\pm S.D.) of triplicate determination using PMN cells from 3 healthy subjects (○, ●, ▲).

NK活性はTable 6およびTable 1に示した様にそれぞれ $61.2 \pm 8.6\%$ および $71.6 \pm 8.1\%$ であり両者に有意差は認められず、他の線量においても同様であった。

考 案

X線照射後の末梢単核球のNK活性は、測定の時期によって大きな変動を示し、8Gyの照射では照射直後および2時間後にもじろ上昇の傾向を示した。このような低線量照射時のNK活性の上昇は、Dean⁸およびBroval⁹も認めており、NK細胞よりも radiosensitive であるNK活性に対する

Table 6 Augmentation of NK activity by IL-2 treatment at 24 and 72 hrs after irradiation (E : T=10 : 1). 1) mean of the calculated augmentation index in PMN cells. 2) mean of the calculated remaining NK activity in PMN cells.

Dose of X-ray	A		B		C		D		¹⁾ Augmentation Index IL-2 (+)/(-)
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	
after 24 hrs									
0 Gy	21.4	33.9	12.2	22.7	31.4	46.6	29.3	44.4	1.60 ± 0.17
8	11.6	25.8	8.6	20.6	21.6	38.4	19.6	36.5	2.06 ± 0.29
16	10.4	25.7	5.2	13.3	16.8	29.5	18.4	33.6	2.15 ± 0.42
30	1.3	5.1	0.3	2.2	3.6	12.4	2.4	11.6	4.92 ± 1.70
after 72 hrs									²⁾ Remaining Activity(%)
0 Gy	34.1	44.9	12.4	22.7	33.5	52.4	28.6	49.2	100 100
8	5.0	32.5	2.9	12.1	3.7	33.2	3.2	27.5	15.1 ± 5.8 61.2 \pm 8.6
16	2.7	22.6	3.3	10.7	1.4	13.9	2.1	16.5	11.5 ± 10.2 39.4 \pm 11.2
30	2.6	6.9	4.5	2.2	2.5	3.2	0	5.4	12.8 ± 16.0 10.6 \pm 3.8

suppressor 細胞の存在に起因するとの想定もなされているが明らかではない。照射24時間後には、このような低線量域での NK 活性の上昇は認められず、線量の増加とともに NK 活性は低下し、72時間後には4Gy の低線量域においても著明な低下が認められた。

一方、X線照射は末梢リンパ球に対して細胞質や細胞核に損傷を与え、interphase death をもたらすことが知られており、照射後時間の経過に従って細胞の変性、崩壊を生ずる¹⁰⁾。このような細胞死が NK 活性低下の大きな要因になり得ることは容易に推察される。しかしながら、今回の実験結果では、NK 活性の変動と erythrocin B によって染色されない生細胞数の変動は一致せず、一般に NK 活性の低下に比較すると erythrocin B 法によって算定される生細胞数の減少は軽度であった。

このような不一致の原因の一部は、末梢単核球が均一な集団ではなく、NK 細胞が末梢単核球中数%を占めるに過ぎない¹¹⁾¹²⁾ことによる可能性がある。すなわち、T 細胞や B 細胞がそれぞれ放射線感受性を異にする¹³⁾ように、NK 細胞が末梢単核球全体としての放射線感受性に比較して、より高い放射線感受性を持つことによることが考えられる。しかし、更に大きな要因として、NK 活性の低下が NK 細胞の数の減少によってもたらされるだけでなく、個々の NK 細胞の細胞障害機能の低下によって生ずることが考えられる。Dean ら¹⁴⁾はヒト末梢リンパ球に対して40Gy 照射直後の測定で NK 活性が著明に低下するにもかかわらず、100Gy の照射を行っても⁵¹Cr 放出法にてほとんどリンパ球の破壊を認めないとしている。また、今回の実験でも、30Gy 照射直後に NK 活性は著明に低下したが、erythrocin B によって染色される死細胞はほとんど認められなかった。これらの結果は、X線照射により NK 細胞の数の減少だけでなく、個々の NK 細胞の機能低下を生じたことを示している。

リンパ球の機能に対する in vitro X 線照射がもたらす影響は、Phytohemagglutinin 刺激による³H-thymidine の取り込みによって検討したもの

が多く報告されている。いずれも X 線照射によって³H-thymidine の取り込みが抑制される¹⁴⁾¹⁵⁾との結果であるが、照射時の細胞数を基準としての評価であり、照射後の培養時間中に予測される細胞死との関連については明らかではない。

溶連菌製剤 OK-432 は、抗悪性腫瘍剤として臨床的に既に使用されているが、直接的な抗腫瘍活性を示すのみではなく、その主な作用機序は生体の抗腫瘍免疫を活性化することによる間接的な抗腫瘍活性によることが明らかになりつつある。OK-432 による免疫系の活性化は多岐にわたっており、NK 細胞をはじめとして、Macrophage, キラー T 細胞、好中球など、腫瘍細胞に対して障害作用を持つ各種の effector 細胞の活性化をもたらすと報告されている^{16)~19)}。

著者らは、上に述べたような X 線照射による NK 活性の低下に対する OK-432 の影響を検討した。末梢単核球に対して、in vitro X 線照射直後より OK-432 を添加して培養しておくと、24時間後には 8 および 16Gy の各線量において約 2 倍の NK 活性を示し、非照射時にみられる増強効果と同程度の効果が認められた。一方、72時間後には OK-432 非添加で培養した場合には、2~8Gy の低線量でも著明な NK 活性の低下がみられたのに対し、OK-432 を添加して培養すると NK 活性の低下が極めて軽度であることが注目された。また、OK-432 の添加を照射 48 時間後に行うと、Remaining NK activity は照射直後に添加した場合に比較して有意に減少し、非添加の場合と大差なかった。すなわち、OK-432 のこのような作用の発現には照射直後より添加しておく必要があることが示された。

これらの結果は、OK-432 が非照射末梢単核球に対して示す NK 活性増強作用だけでなく、照射された末梢単核球に対して放射線に対する防護作用を併せ持つことを示唆するようと考えられる。しかしながら、今回認められた効果には照射前や照射中の OK-432 の存在を必要とせず、通常の化学的防護物質としての作用機序と異なる機序の存在を考慮する必要があるであろう。

OK-432 による NK 活性の増強には種々の lym-

phokine の関与が考えられている。Wakasugi ら²⁰⁾は、in vitro にて末梢単核球に OK-432 を添加培養することによって IFN と共に IL-2 が産生されることを示しており、また OK-432 の増強作用は IFN および IL-2 の一方を失活させるだけでは完全には阻害されず、両者を同時に失活させることによって完全に阻害されるとしている。一方、IL-2 が NK 細胞の IFN 産生を刺激するとの報告があり²¹⁾、IL-2 が直接 NK 活性を増強するのみではなく、IFN の産生を介して NK 活性を増強させる可能性も考えられる。

末梢単核球に対して、in vitro X 線照射直後より IFN を添加して培養しておくと、24時間後には OK-432 と同様に非照射時と同程度の NK 活性増強効果を認めた。また、IFN による NK 活性増強作用は 1 時間の処理で認められたが、このように短時間の内に効果が発現することは、この増強作用が細胞膜に対しての作用であることを示唆している²²⁾。Ortaldo ら²³⁾は、RNA や蛋白合成阻害剤によって、IFN による NK 活性増強作用が障害される一方、DNA 合成阻害剤である Mitomycin C や X 線 1,500R 照射によっては、末梢単核球の NK 活性の低下を認めるが、IFN による増強作用は障害されないと報告しており、著者らの結果と合致するものと考えられる。

一方、IL-2 は、1976 年 Morgan ら²⁴⁾が T 細胞増殖因子 (T cell growth factor) としてその存在を明らかにした lymphokine の一種であり、最近その機能は T 細胞の分化/増殖以外にも多岐にわたることが明らかにされつつある²⁵⁾。IL-2 が NK 活性増強作用を持つことについては既に多くの報告がある²⁶⁾²⁷⁾。今回の著者らの検討では、非照射末梢単核球の NK 活性を増強させるだけでなく、IFN や OK-432 と同様、照射直後より 24 時間添加培養することによって被照射末梢単核球の NK 活性も増強させることができた。更に、X 線照射 72 時間後にみられる末梢単核球の NK 活性の低下は、IL-2 の添加によって、OK-432 添加の場合と同程度に、著明に軽減された。これに対し IFN は、X 線照射 24 時間後には OK-432 と同程度の NK 活性増強効果を示すが、72 時間後にみら

れる NK 活性の低下を軽減する効果は有意に少なかった。

なお、IL-2 がレクチン刺激なしでは、T 細胞の増殖はもたらさず large granular cell (NK 細胞) のみを増殖させるとの報告があり²⁸⁾、このような NK 細胞に対する増殖促進作用が、X 線照射 72 時間後にみられる NK 活性の低下を軽減させる要因となっている可能性も考えられる。この点について、末梢単核球の X 線照射を受けた後のレクチン非刺激下での³H-thymidine の取り込みを検討すると、OK-432、IL-2 を添加して培養した時には、IFN 添加時に比較して有意の高値であったが、erythrocin B 法による照射後の細胞生存率には 3 者間に有意差が認められなかった（結果示さず）。しかし、細胞生存率に差が認められなかったのは、末梢単核球の一部を占めるに過ぎない NK 細胞の活性化や増殖を捉え得なかつことによる可能性があり、今後の検討課題と考えられる。

このような知見より、X 線照射した末梢単核球に OK-432 を添加して、72 時間後に認められる NK 活性低下の軽減効果には IL-2 の産生が大きな要因を占めているように考えられる。しかしながら、OK-432 は末梢単核球から IFN、IL-2 とは異なる NK activating factor の産生をもたらすとの報告²⁹⁾もあり、これら他因子の関与も否定できない。

一方、あらかじめ OK-432 および IFN によって増強された末梢単核球の NK 活性に対する X 線照射の影響も検討したが、どちらの場合も 24 時間後には、非増強の対照と同様な線量依存性の NK 活性の低下を示した。すなわち、これらの lymphokine によって活性化される前後の NK 細胞の放射線感受性はほぼ同じと考えられる。

以上著者らは、ヒト末梢単核球を用いて in vitro X 線照射による NK 活性の変動、および OK-432、IFN、IL-2 の NK 活性増強作用に対する X 線照射の影響について検討した。まず第一に重要な知見は、これら 3 者の NK 活性増強作用が末梢単核球への X 線照射によって損なわれず、またあらかじめ OK-432 や IFN の投与によって in vitro で増強された末梢単核球の NK 活性が、非

増強の末梢単核球のNK活性と同様の放射線感受性を保っていたことである。これらの事実は、放射線治療によって低下するNK活性をOK-432やIFNの投与によって上昇させ得る可能性を示している。次に注目されたのは、X線照射72時間後にみられるNK活性の低下が、OK-432を添加培養することによって著明に軽減されたことと、IL-2がこれに関与する可能性が示唆されたことである。以上の成績はOK-432の多岐にわたる作用の一部を明らかにするとともに、これを放射線治療に併用することの意義を示唆しており、臨床例での効果について更に検索を進めている。

結語

放射線治療における非特異的免疫療法併用の意義を明らかにする為の基礎的検討として、*in vitro* X線照射によるヒト末梢単核球のNK活性の変動、およびOK-432、IFN、IL-2のNK活性増強作用に対するX線照射の影響について検討し、以下の知見を得た。

1) *in vitro* X線照射後の末梢単核球のNK活性は、測定の時期によって大きな変動を示したが、照射24時間後には線量依存性に低下し、72時間後には4Gyの低線量においても著明に低下した。

2) 末梢単核球をX線照射後、OK-432、IFN、IL-2をそれぞれ24時間添加して培養した場合に認められるNK活性増強作用は、非照射末梢単核球に対して認められるNK活性増強作用と同程度であった。

3) OK-432またはIFNによってあらかじめ増強された末梢単核球のNK活性は、X線照射24時間後には、非増強の末梢単核球のNK活性と同様の放射線感受性を示した。

4) X線照射72時間後に認められる末梢単核球のNK活性の著明な低下は、照射直後よりOK-432およびIL-2を添加することによってそれぞれ大幅に軽減されたが、IFNの軽減効果は有意に少なかった。

本論文の要旨は、第42、43回日本医学放射線学会総会において発表した。

文献

1) Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C.: H-2

compatibility requirement for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Different cytotoxic T-cell specificities are associates with structures coded for in H-2K of H-2D. *J. Exp. Med.*, 141: 1427-1436, 1975

- 2) Nunn, M.E. and Heberman, R.B.: Natural cytotoxicity of mouse, rat, and human lymphocytes against heterologous target cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 62: 765-771, 1979
- 3) Kiessling, R. and Wigzell, H.: An analysis of the murine NK cells as to structure, function and biological relevance. *Immunol. Rev.*, 44: 165-208, 1979
- 4) 根住直史、小西淳二、御前 隆、小野公二、高橋正治、阿部光幸、鳥塚莞爾：放射線治療による悪性腫瘍患者免疫関与細胞の変動について—特にNatural killer活性について—。日本医学会誌, 43: 1415-1425, 1983
- 5) Uchida, A. and Hoshino, T.: Clinical studies on cell-mediated immunity in patients with malignant disease I. Effect of immunotherapy with OK-432 on lymphocyte subpopulation and phytomitogen responsiveness *in vitro*. *Cancer*, 45: 476-483, 1980
- 6) 山村雄一：抗癌免疫—その進歩と反省—。癌と化學療法, 10, Part II: 311-319, 1983
- 7) 押株和夫、狩野庄吾：Natural killer細胞活性定法。日臨免疫, 3: 225-230, 1980
- 8) Dean, D.M., Pross, H.F. and Kennedy, J.C.: Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells-III Stimulatory and inhibitory effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Bio. Phys.*, 4: 633-641, 1978
- 9) Brovall, C. and Schacter, B.: Radiation sensitivity of human natural killer cell activity: Control by X-linked genes. *J. Immunol.*, 126: 2236-2239, 1981
- 10) Schrek, R. and Ott, J.N.: Study of the death of irradiated and nonirradiated cells by time-lapse cinemicrography. *Arch. Path.*, 53: 363-378, 1962
- 11) Timonen, T., Ortaldo, J.R. and Herberman, R.B.: Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J. Exp. Med.*, 153: 569-582, 1981
- 12) Neville, M.E.: Human killer cells and natural killer cells: distinct subpopulation of Fc receptor-bearing lymphocytes. *J. Immunol.*, 125: 2604-2609, 1980
- 13) Kwan, D.K. and Norman, A.: Radiosensitivity

- of human lymphocytes and thymocytes. Radiat. Res., 69 : 143—151, 1977
- 14) Ilbery, P.L.T., Rickinson, A.B. and Thrum, C. E.: Blood lymphocytes replicating ability as a measurement of radiation dosage. Brit. J. Radiol., 44 : 834—840, 1971
- 15) Baral, E. and Blomgren, H.: Response of human lymphocytes to mitogenic stimuli after irradiation in vitro. Acta Radiol. Ther. Phys. Biol., 15 : 149—161, 1976
- 16) Wakasugi, H., Oshimi, K., Miyata, M. and Morioka, Y.: Augmentation of natural killer (NK) cell activity by a streptococcal preparation, OK-432, in patients with malignant tumors. J. Clin. Immunol., 1 : 154—161, 1981
- 17) Matsunaga, K., Mashiba, H. and Gojobori, M.: Cytotoxic activity of in vitro activated human adherent cells against human tumor cell lines. Gann, 71 : 73—79, 1980
- 18) Hojo, H. and Hashimoto, Y.: Cytotoxic cells induced in tumor-bearing rats by a streptococcus preparation (OK-432). Gann, 72 : 692—699, 1981
- 19) Katano, M. and Torisu, M.: neutrophil-mediated tumor cell destruction in cancer ascites. Cancer, 50 : 62—68, 1982
- 20) Wakasugi, H., Kasahara, T., Minato, N., Hamuro, J., Miyata, M. and Morioka, Y.: In vitro potentiation of human natural killer cell activity by a streptococcal preparation, OK-432: Interferon and interleukin-2 participation in the stimulation with OK-432. J. Natl. Cancer Inst., 69 : 807—812, 1982
- 21) Handa, K., Suzuki, R., Matsui, H., Shimizu, Y. and Kumagai, K.: Murine NK cells as a responder cell to interleukin 2. IL-2-induced interferon production. J. Immunol. 130 : 988—992, 1982
- 22) Ortaldo, J.R., Herberman, R.B. and Djeu, J.Y.: Characteristics of augmentation by interferon of cell-mediated cytotoxicity. (In) Herberman, R.B., ed : Natural cell mediated immunity against tumors. pp. 593—607, 1980, Academic Press, New York
- 23) Ortaldo, J.R., Phillips, W., Wasserman, K. and Herberman, R.B.: Effects of metabolic inhibitors on spontaneous and interferon-boosted human natural killer cell activity. J. Immunol., 125 : 1839—1844, 1980
- 24) Morgan, D.A., Ruscetti, F.W. and Gallo, R.: Selective in vivo growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. Science, 193 : 1007—1008, 1976
- 25) Smith, K.A.: T-cell growth factor. Immunol. Rev., 51 : 337—356, 1980
- 26) Henny, C.S., Kurabayashi, K., Kern, D.E. and Gillis, S.: Interleukin-2 augments natural killer cell activity. Nature, 291 : 335—338, 1981
- 27) Domzig, W., Stadler, B.M. and Herberman, R. B.: Interleukin 2 dependence of human natural killer (NK) cell activity. J. Immunol., 130 : 1970—1973, 1983
- 28) Vose, B.M. and Bonnard, G.D.: Limiting dilution analysis of the frequency of human T cells and large granular lymphocytes proliferating in response to interleukin 2 1. The effect of lectin on the proliferative frequency and cytotoxic activity of cultured lymphoid cells. J. Immunol., 130 : 687—693, 1983
- 29) Ichimura, O., Suzuki, S., Sugawara, Y. and Osawa, T.: Characterization of mouse natural killer cell activating factor (NKAf) induced by streptococcus preparation, OK-432. (In) Proceedings of the international symposium on natural killer activity and its regulation. pp. 208—213, 1983, Excerpta Medica, ICS No. 641, Amsterdam.