The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト白血球インターフェロンの抗腫瘍作用と放射線併用効果について(in vitro)
Author(s)	伊藤, 秀源
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1981, 41(6), p. 551-558
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/17917
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

ヒト白血球インターフェロンの抗腫瘍作用と放射線併用効果について (*in vitro*)

京都府立医大学放射線医学教室
伊 藤 秀 源

(昭和55年12月22日受付)
(昭和56年1月23日最終原稿受付)

Antitumor and Radiation Sensitizing Effects of Human Leukocyte Interferon in vitro

Hidemoto Ito
Department of Radiology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Research Code No.: *407.9*
Key Words: *Antitumor effect, Sensitizing effect, KB cell, Interferon*

The antitumor and radiation sensitizing effects of interferon (IF) on human fibroblast and KB cell were studied in vitro. Both types of the cells were irradiated by ^{60}Co-γ-rays. When the fibroblast was cultured with IF preparation, IF preparation did not suppress its growth. But the growth of the KB cell was suppressed by IF treatment. When fibroblast was irradiated together with IF treatment (pretreated and posttreated), no effect was detected on its growth. When KB cell was irradiated together with IF preparation, only post-treatment with IF preparation affected its growth. Furthermore, KB cell was studied by the colony formation method. The radiation effect was enhanced by treatment with IF preparation.

緒 論

Interferon (IF と略す) は1954年，長野と小島[1]により「ウィルス抑制因子」として発見され，1957年 Isaacs と Lindenman[2] により Interferon と命名されてその存在を認められた物質である．この IF はウイルス増殖抑制効果の他に様々な作用を有することが報告されてきた．即ち，1962年 Paucker[3] らにより培養細胞の増殖率を低下させることが発見され，又，1965年 Todaro と Baron[4]，岸田[5)6)]らにより腫瘍ウイルスによる腫瘍の形成を阻止することが報告された．更に，Gresser[14)15)]らによる腫瘍細胞の増殖抑制作用，腫瘍移植を受けた動物に対する延命効果があることなどの報告が続き，IF の抗腫瘍作用が次第に認められてきた．IF によるヒト悪性腫瘍の治療も既に試みられてきているが，単独治療の効果は期待したほど大きいもの[7)8)9)10)11)16)]ではない．そこで IF と他の化学療法剤との併用効果についての研究がすすめられ，その有効性が確かめられている．しかしながら，腫瘍に対する IF と放射線療法との併用についての基礎的実験についての報告は非常に少ない．IF と放射線照射を如何に組み合せるかは非常に複雑であるため *in vivo* の実験はなかなか困難である．そこでとりあえず *in vitro*

での IF と放射線療法の併用効果についての基礎研究を行うことが必要と思われる．本研究においては，放射線照射と IF と併用した場合の正常細胞及び腫瘍細胞に対する効果について，*in vitro* において，増殖曲線とコロニー形成法を指標として検討した．

材料と方法

(1) 細胞培養と培養条件

対象とした細胞は腫瘍細胞を代表するものとして，ヒトロ腔底癌由来の株化細胞である KB 細胞及び正常細胞を代表するものとして，ヒト胎児より得た線維芽細胞である．

培地は10%仔牛血清加 Eagle MEM を使用したが，コロニー形成の場合は20%胎児牛血清を使用した．培養は37℃，空気95%，炭酸ガス5%の条件で直径60mm のプラスチックシャーレを用いて行なった．コロニー形成の場合は培養開始後3週間後に固定染色した後コロニー数を計数した．

2) Interferon (IF) 試料

用いた IF 試料はヒト白血球と HVJ の系より得られたヒト白血球インターフェロンの凍結乾燥品（5万国際単位 (IU/vial) であり，使用直前に培養液で希釈し使用した．

3) 放射線照射

放射線照射は，^{60}Co 照射装置（島津製 RTGS-2 型）を用いた．線源から培養液中点までの距離を80cm とし，培地内での線量分布を均等にするために，6mm 厚のアクリル板の上に細胞と分離浮遊させたプラスチックシャーレ (Falcon 製) をのせて線源を180度回転させて下から照射した．照射野は10×10cm とし，この点での線量率は30.65rad/min であった．線量測定には Victoreen condesor R-meter, Probe No. 621を用いた．

4) 放射線照射と IF の投与法並びに効果判定

効果の判定には細胞増殖曲線とコロニー形成法を用いた．

増殖曲線は IF を含まない培養液で培養した場合を対照とし，IF 10 IU, 100 IU, 1,000 IU を含むように希釈した培養液で7日間培養し，毎日，対照と各 IF 濃度群につきシャーレ3ケづつをフックス＝ローゼンタール計算板を用いて計数，平均値をもって細胞数とした．

放射線照射と IF を併用した場合は，増殖曲線を用いて検討したもの以外に，KB 細胞についてはコロニー形成法を用いて検討も行なった．即ち，増殖曲線を用いた場合は初めに放射線を200 rad と600rad 照射してから IF 1,000 IU を含む培地と対照として IF を含まない培地で培養した前照射後投与例と，初めに IF 1,000 IU を含む培養液で48時間培養した後，IF を洗滌除去してから200rad, 600rad を照射した後，通常の培地を用いて細胞増殖させた前投与後照射例である．

コロニー形成法の場合は初めに放射線を100 rad, 200rad, 400rad, 600rad 照射してからシャーレに単離した KB 細胞を入れ，細胞がシャーレに着床してから，IF 10IU, 100IU, 1,000IU の各濃度を含む培養液を入れたままでコロニー形成させた場合と，IF 10IU, 100IU, 1,000IU の各力価を含む培養液で24時間培養してから IF を洗滌除去し，上記各線量の放射線を照射してからコロニー形成させた場合の二種類の照射法について検討した．

結　果

1) IF による細胞増殖抑制

線維芽細胞と KB 細胞の増殖に対する IF 単独投与の効果を，増殖曲線によって示したのが Fig. 1, 2 である．即ち，IF 非添加の培養液のみで培養した場合を対照とし，それぞれ IF 10 IU, 100 IU, 1,000 IU を含んだ培養液で培養した結果得られた増殖曲線である．培養期間は7日間であった．

線維芽細胞の場合には対照と IF 投与群との間に差は認められなかった (Fig. 1, 細胞倍加時間24時間)

これに対して KB 細胞の場合には IF 濃度に比例して増殖の抑制が認められた．この場合，各濃度下の増殖曲線の直線部分の勾配には変化は認められなかった (Fig. 2, 細胞倍加時間30時間)．

2) 放射線照射と IF 投与との併用効果

① 照射後に IF を投与した場合及び照射前に

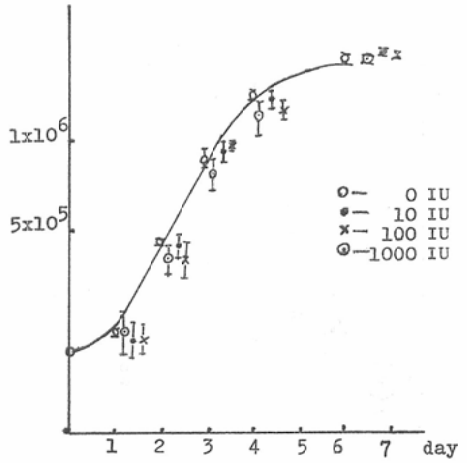


Fig. 1　Growth Curve of Human Fibroblast Cell

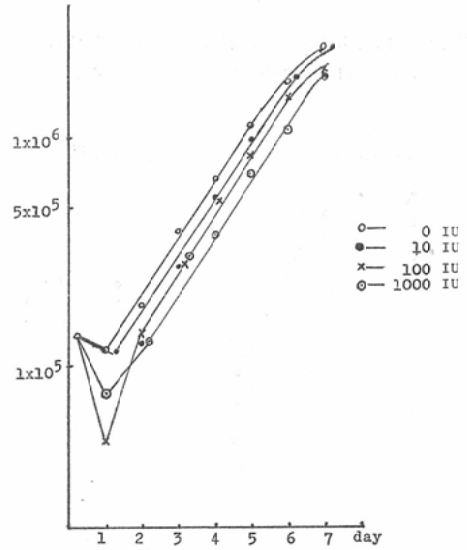


Fig. 2　Growth Curve of KB Cell

IF を投与した場合の各々について増殖曲線に及ぼす影響を検討した．一前照射 IF 後投与—あらかじめ200rad, 600rad 照射を行なった後 IF 1,000 IU を含む培養液中で増殖させた結果が Fig. 3 とFig. 4 である．線維芽細胞を用いた場合には非照射対照と200rad 照射群では照射後 IF の存在下に培養することにより増殖がむしろ促進される傾向がうかがわれる．

600rad 照射群では対照との差は認められない (Fig. 3)．いずれの場合も IF の存在下に培養

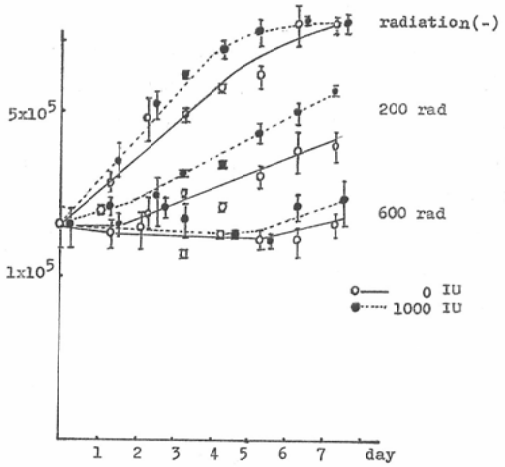


Fig. 3　Grouth Curve of Human Fibroblast cell after irradiation, cultured in IF contained medium

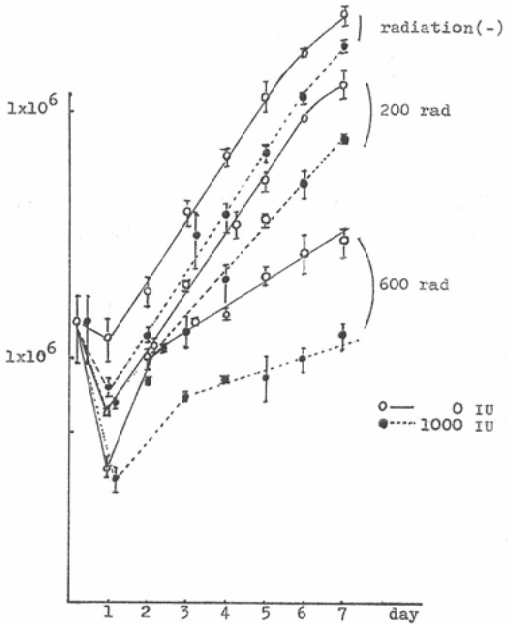
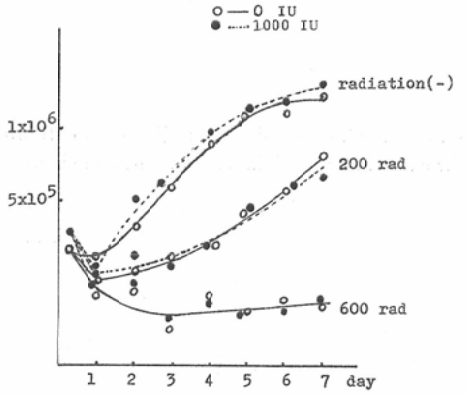


Fig. 4　Grouth curve of KB cell after irradiation, cultured in IF contained medium

することより線維芽細胞の増殖が抑制される傾向は認められなかった．KB 細胞に対し照射後に IF 1,000 IU を含む培養液中で増殖させた結果が Fig. 4 である．この場合，増殖が照射単独に比し IF 存在下でより強く抑制されていることが認められる．

② —IF 前投与，後照射—

まず IF を細胞に作用させ，IF を除去した後に放射線照射を行なった場合の効果は Fig. 5, Fig. 6 に示す通りである．線維芽細胞を1,000 IU の IF を含む培養液で48時間培養した後，200rad, 600rad の放射線照射を行なった場合の増殖曲線は Fig. 5 に示す通りである．IF の前処置を行なった場合と照射単独との増殖曲線に差は全く認められなかった．



Fi3. 5 Growth Curve of Human Fibroblast Cell irradiation after culture in IF contained medium for 48hr

一方，KB 細胞の場合 IF 1,000 IU を含む培養液で48時間培養した後，200rad, 600rad 照射した結果は Fig. 6 に示す通りである．この場合も IF の前処置による差は認められなかった．

以上，いずれの場合においても，トリパンブルーにより判定した結果，IF には細胞毒性は認められなかった．

一般に放射線の殺細胞効果を定量的に検討する場合，コロニー形成法が用いられる．これにより1個の細胞の分裂能の喪失の有無を正確に知ることができる．KB 細胞は悪性腫瘍由来細胞でコロニーを形成する．一方，正常細胞由来である線維芽細胞はコロニーを形成しないのでコロニー形成法を用いることはできない．従って KB 細胞についてのみ，コロニー形成法により IF と放射線照射との併用効果につき検討した．

放射線照射を行なってから IF 10 IU, 100 IU

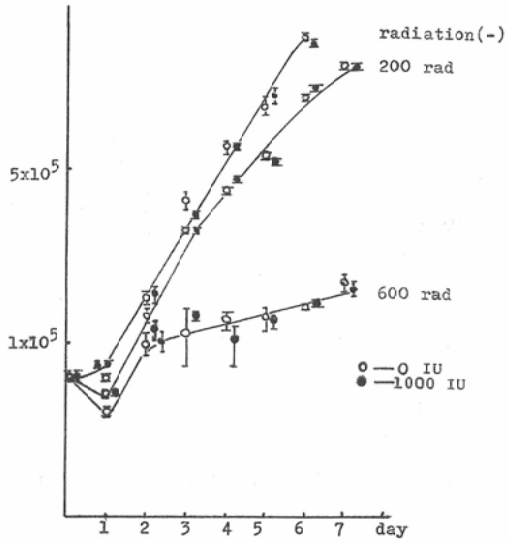


Fig. 6 Growth Curve of KB Cell irradiation after culture in IF contained medium for 48hr

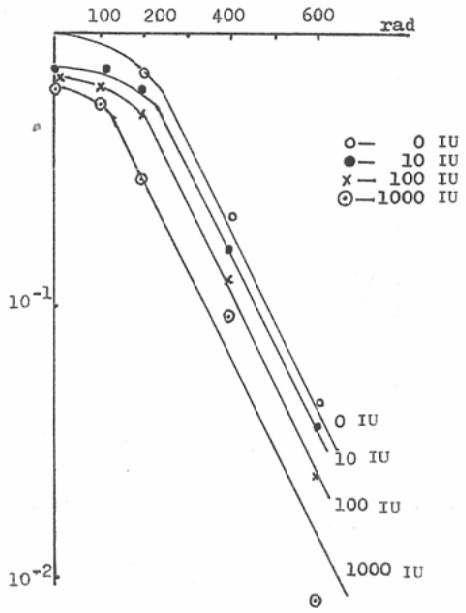


Fig. 7 Dose-survival Curve after irradiadiation, cultured in IF contained medium

1,000 IU の各濃度を含む培地でコロニー形成させて得られた線量効果曲線が Fig. 7 である．IF 濃度に比例した効果の増強が認められた．各曲線の直線部分における勾配はいずれも対照と等し

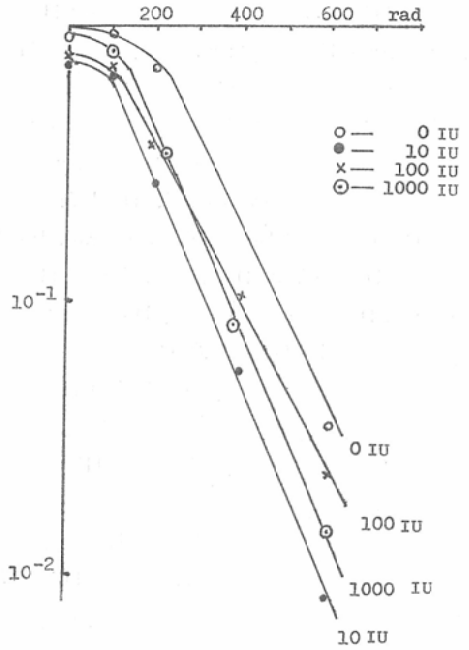


Fig. 8 Dose-survival Curve irradiation after culture in IF contained medium for 24hr

く，Do は135rad であった．

一方，放射線照射を行う前に，各濃度の IF を含む培地で24時間培養し，IF を除去してから放射線照射を行なった結果が Fig. 8 である．

この場合は前照射の場合と異なり最も低い濃度である10IU 投与群が高い濃度を用いた場合より強い効果を示した．

考　察

臨床的に悪性腫瘍患者に IF を投与する為にはヒトの IF を用いなければならない．

IF には種依存性があるためである．既に骨肉腫[7]，悪性リンパ腫[9)10)]，その他の悪性腫瘍[8)11)]に対して臨床的に投与され効果を認めた報告もある．又，マウスを用いたものでは，IF と Microwave を利用した hyperthermia[12)] との併用効果の検討により，その効果の増強を認めた報告もある．しかし，放射線照射と IF の併用効果に関しては動物，ヒトを通じて検討がなされていない．本研究では悪性腫瘍を効果的に治療する為に，放射線照射と IF の併用効果について，ヒト IF とヒト細胞を用いて *in vitro* でその基礎的検討を加えることが目的である．*in vitro* の実験であるため，制約はあるができる限り臨床応用の条件に近い系で検討を行ないたいと考えた．即ち，人体の悪性腫瘍に対して放射線を照射する場合，腫瘍細胞のみ選択的に照射することはできず，必らず周囲にある正常組織を同時に照射し，障害を与えることになる．できるかぎり腫瘍細胞には強い障害を，正常細胞には障害を少なくすることが治療効果を高めるうえで重要になってくる．そこで本研究においては腫瘍細胞として悪性腫瘍細胞である KB 細胞を，正常細胞として線維芽細胞を選び，IF 単独投与による効果と，IF と放射線の併用による効果の両者につき比較検討した．通常，放射線の効果を調べるためには，コロニー形成法により，個々の細胞の生死を判定し，線量効果曲線を得て，Do（線量効果曲線の直線部分における生存率を37％に減少させるのに必要な線量で，感受性を示す），又は Dq（線量効果曲線の直線部分を外挿し，100％生存点より横軸に平行に引いた線との交点で sublethal damage からの回復能力を示す），などを用いて効果を比較する．正常組織より得た株化されていない培養細胞が，*in vitro* において正常か否かは断定しがたいが，transform しないかぎり良性細胞として考えることができる一方，コロニーを形成する細胞は一般的に悪性細胞であり，正常組織由来の良性細胞は，骨髄細胞のような例外を除いてコロニーを形成しない．このため，線維芽細胞についてはコロニー形成法では検討できないので，増殖曲線を用いて検討することとした．すなわち，線維芽細胞と KB 細胞を全く同じ条件で，同じ処置を加え，これに依って得られた結果から IF の正常組織と悪性腫瘍細胞に対する効果の相違を推測した．Fig. 1 と Fig. 2 より線維芽細胞には増殖抑制作用が認められず，腫瘍細胞である KB 細胞にのみ抑制効果が認められ，その効果は IF の濃度に比例し，1,000 IU では対照の約1/2に増殖を抑制した．更に計数に際して死細胞を認めなかった．従来の抗癌剤がその細胞毒性により腫瘍細胞

と共に正常組織に対しても障害を与えてその効果を得ていたのに比較して，IF がこのように細胞毒性を示さず，且つ，悪性細胞の増殖を抑制することは，副作用の発現が少ないものと考えられる．

一方，その腫瘍縮少作用には限界があることが考えられ，他の治療法との併用の可能性が考えられることになる．

放射線を併用した場合で，放射線照射後に IF を投与した場合が Fig. 3 と Fig. 4 であるが，線維芽細胞では，IF の存在によって放射線の効果が高められることはなかった．一方，KB 細胞では照射により明らかに IF の存在により増殖の抑制を認め，細胞倍加時間は200rad 照射例で対照の31.2時間から39.6時間に，600rad 照射した場合は対照の72時間から134.4時間と延長が認められ，高い線量を照射するほど IF による併用効果が強くなる傾向が認められる．

この場合のように，正常組織由来である線維芽細胞には併用による効果がなく，悪性細胞である KB 細胞に対しては効果が現われることは治療効果比を上げるうえで大変好ましいことである．次に照射する前に IF を投与してから照射を行なった Fig. 5, 6, では，いずれの場合にも併用効果は認められなかった．線維芽細胞については IF の投与の方法にかかわらず併用による効果がなく，KB 細胞は照射の前と後でその効果の現われ方に相違があることを示している，即ち，照射前に投与した場合は効果がなく，照射してから IF を投与すると効果が現われてくる．治療と言う点から考えると，IF は放射線を照射したあとから投与すると，正常組織には作用がなく，悪性腫瘍に対してはより放射線の効果を強めることができ，治療効果比を高めることが可能と思われる．

終りに KB 細胞のコロニー形成法による併用効果について，照射前と後に分けて Fig. 7 と 8 で検討した．照射後 IF を投与した場合（Fig. 7），対照の Do は135rad で IF と併用した群では濃度に比例した効果を得たが，それらの Do には差がなく同じ135rad であった．相違は Dq にあり，10 IU 投与では Dq は195rad, 100 IU では160rad, 1,000 IU では110rad と高濃度の IF を投与した方が少なくなる傾向が認められ，照射による障害からの回復を抑制することにより併用効果が現われていることが考えられる，照射前に投与した場合，対照の Do 135rad, Dq 185rad に対して，10 IU 投与で Do 115rad Dq 90rad, 100 IU 投与では Do 145rad Dq 85rad, 1,000 IU では Do 119rad, Dq 105rad が得られ，Do で示される感受性については10 IU 1,000 IU がよいが，回復能力を示す Dq については10 IU, 100 IU がより効果的である．全体として低い単位である10 IU がより効果的と考えられ，照射後に IF を投与した場合と逆の結果となった．照射をしなかった場合もコロニー形成で見るかぎり，IF を含む培地でコロニー形成した場合と IF 1,000 IU 24時間接触させた後に IF を除去してから培養液のみでコロニー形成させた場合で，その効果が逆転している．

増殖曲線において IF 1,000 IU 投与した場合 KB 細胞は併用による差を認めていないが，これはより低い10 IU で行なえば差が出た可能性もあるが，方法論的に増殖曲線とコロニー形成法とでは，その定量性に違いがあるために差が見られなかったとも考えられる．

KB 細胞のコロニー形成法による放射線併用効果は照射前に IF を投与した方が Do, Dq 共に減少し増感効果が認められるが，IF 単独のコロニー形成に対する効果が，照射後 IF 投与群に比して低くなっているために，全体として効果的でなく，結局10 IU 群が最も強い併用効果を得ている．増殖曲線，コロニー形成法を合せて考慮すると，放射線の併用効果を高めるためには照射終了後に IF を投与した方が効果的であり，もし照射前に投与する場合には高い濃度の IF は不要で，むしろ低い濃度の IF がより効果的と考えられる．

in vitro において IF を投与した場合，温度37°C で培養液に含めているが，この場合，経時的な IF 濃度の変化について測定した結果が Table 1

Table 1

hr.	medium only	with KB cells
0	1300 IU	
22	1093 IU	1093 IU
48	1093 IU	1093 IU
72	651 IU	548 IU
96	1863 IU	920 IU

である．5万 IU を希釈して1,000 IU として，直ちに－20℃に凍結した場合，実測によると1,300 IU を示した．22時間後から96時間後まで24時間毎に測定した結果，4日後においてもほぼ初めの単位が保たれ，細胞の存在した場合と，培養液のみの場合でも著しい差は認めなかった．

結　論

in vitro において，ヒト線維芽細胞と KB 細胞，ヒト白血球インターフェロンの系を用いて IF の作用と，IF と放射線を併用した場合の効果について検討した．

1) IF はヒト線維芽細胞の増殖に対して1,000 IU までの濃度では影響を与えなかった．

2) IF は KB 細胞の増殖を抑制し，その効果は IF の濃度に比例した．

3) いずれの場合においても，トリパンブルーによる染色において，細胞毒性を認めなかった．

4) IF と放射線を併用した場合，増殖曲線で検討した範囲では，ヒト線維芽細胞に対して照射の前後に IF を投与しても，いずれの場合においても増殖の抑制を認めず，併用効果を認めなかった．一方 KB 細胞の場合は照射後に IF を投与した場合に併用効果を認めた．

5) KB 細胞のコロニー形成法の場合，照射後に投与した時は IF 濃度に比例して放射線の作用を高めたが，IF 前投与後照射した場合は，IF は低い濃度の方がより効果的であった．

稿を終るにあたり，御指導，御校閲を賜わった恩師村上晃一教授に深甚なる謝意を捧げると共に終始御助言，御援助下さった微生物学教室岸田綱太郎教授，今西二郎助教授，線維芽細胞を提供して下さった朴鎮彬博士，IF の提供並びに単位測定を行なって下さったミドリ十字松尾昭夫博士並びに教室員の諸兄姉に深く感謝する．

尚，本研究の一部は文部省科学研究費によって援助を受けて行なわれたものであることを附記する．

Reference

1) Nagano, Y. and Kojima, Y.: Pourvoir immunisant du virus vaccinal inactivé par des rayons ultraviolets. C.R. Soc. Biol., 148: 1700—1702, 1954

2) Isaacs, A. and Lindenmann, J.: Virus interference. I. The interferon. Proc. Ray. Soc. Ser. B., 147: 258—267, 1957

3) Paucker, K., Cantell, K. and Henle, W.: Quantitative studies on viral interference in suspended cells. III. Effect of interfering viruses and interferon on the growth rate of cells. Virology, 17: 324—334, 1962

4) Todaro, G.T. and Baron, S.: The role of interferon in the inhibition of SV_{40} transformation of mouse cell line $_3T_3$. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 54: 752—756, 1965.

5) 岸田綱太郎：インターフェロンシステムと腫瘍，特にその抗腫瘍性について．ウイルス学の進展（第12回ウイルスシンポジウム記録）京大ウイルス研究所編，42—59，1972

6) Kishida, T., Toda, S., Toida, A. et Hattori, T.: Effet de l'interféron sur la cellule maligne de la souris. C.R. Soc. Biol., 169: 1489—1492, 1971

7) Strander, H., Cantell, K., Jakobsson, P.A., Nilsonne, U. and Soderberg, G.: Exogenous interferon therapy of osteogenic sarcoma. Acta Orthop. Scand., 45: 958—959, 1974

8) Ikić, D., Krušić, J., Čupak, K., Car, D., Roguljić, A., Jakaša, V., Jušić, D., Šooš, E. and Turner, V.: The use of human leukocyte ineterfron in patients with cervical cancer and basocellular cancer of the skin. Proc. Symposium on Clinical Use of Interferon. edt. by Yugoslav Acad. 239—243, 1975

9) Blomgren, H., Cantéll, K., Johansson, B., Lagergren, C., Fingborg, W. and Strander, H.: Interferon therapy in Hodgkin's disease. Acta. Med. Scand., 199: 527—532, 1976

10) Merigan, T.C., Sikora, K., Breeden, J.H. and Rosenberg, S.A.: Preliminary observations on the effect of human leukocyte interferon in non-Hodgkin's lymphoma. N. Eng. J. Med., 299: 1449—1453, 1978

11) Mellstedt, H., Björkholm, M., Johansson, B., Ahre, A., Holm, G. and Strander, H.: Interferon therapy in myelomatosis. Lancet. Feb., 3: 245—247, 1979

12) Szmigielski, S., Luczak, M., Bielec, M., Janiak, M., Kobus, M., Stewart, W.E. II. and de Clerq, E.: Effect of microwaves combined with interferon and/or interferon inducers (polyI-polyC) on development of sarcoma 180 in mice. J. Microwave Power, 11: 174—175, 1976
13) Chirigos, M.A. and Pearson, J.W.: Cure of murine leukemia with drug and interferon treatment. J. Nat. Cancer Inst., 51: 1367—1368, 1973.
14) Gresser, I.: The antitumor effect of interferon preparations in mice. Symp. Series Immunobiol. Standard, 14: 209—212, 1970
15) Gresser, I.: Interferon and cancer; Therapeutic prospects. Rev. Eur. Etud. Clin. Biol., 15: 23—27, 1969
16) 今西二郎，伊藤秀源，横田芳武，岸田綱太郎：インターフェロンの抗腫瘍性について．最新医学，29：720—722，1979
17) 増田祥男，福間久俊，別府保男：人インターフェロンの抗腫瘍性．臨床整形，14：131—138，1979
18) 伊藤秀源，今西二郎，岸田綱太郎：ヒトインターフェロンの産生とその臨床応用．臨床とウイルス，3：97—107，1975