



Title	Sarcoma 180細胞の放射線照射に及ぼすインターフェロンの修飾効果
Author(s)	三好, 武美; 齊藤, 正好; 有水, 昇 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1984, 44(1), p. 88-92
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19180
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Sarcoma 180細胞の放射線照射に及ぼす インターフェロンの修飾効果

* 千葉大学医学部放射線医学教室

** 安田火災海上保険株式会社健康開発センター診療部

三好 武美* 齊藤 正好* 有水 昇* 秋山清一郎**

(昭和58年10月13日受付特別掲載)

(昭和58年11月22日最終原稿受付)

Modifying Effects of Interferon (IFN) on the Growth of Irradiated Sarcoma 180 Cells In Vitro

Takeyoshi Miyoshi*, Masayoshi Saito*, Noboru Arimizu*
and Seiichiro Akiyama**

*Department of Radiology, School of Medicine, Chiba University

**General Medical Center for Improvement of Health, Yasuda Fire and Marine Insurance Co. Ltd

Research Code No.: 402, 402.3

Key Words: Radiation, Interferon (IFN), Increasing of cell
growth suppression, Radioprotective activity, Sar-
coma 180 cell

Modifying effects of interferon (IFN) on irradiated sarcoma 180 cells were studied in this report. The cells were irradiated with various doses of ^{60}Co γ -ray. One thousand four hundred U/ml of IFN, produced from mouse L-929 cells induced by New castle disease virus (NDV), were added in cell culture medium and growth pattern was observed by colony formation method.

The enhancement of growth suppression was clearly observed when these cells were treated with IFN after irradiation, but was still not clear to be additive or synergistic to radiation-induced suppression. When the cells were treated with IFN before irradiation, IFN reduced the effect of radiation on these cells, or showed a radioprotective activity.

On the other hand, when IFN had continuously acted for long-time on cultured cells, suppression of cell growth were decreased less than those of short-time working of IFN on cultured cells and were clearly reduced on the irradiated cells. These phenomena on the cells treated with IFN were unknown up to this time. It is likely that IFN has two different functions on cell growth—the first a retardation of cell growth from a short time application of IFN and little effects on cell proliferation after long time IFN treatment. On the irradiated cells, the negative effect together with the radioprotective effect might be in effect for long-time action of IFN, even when these cells were irradiated before IFN administration.

インターフェロン(IFN)はウイルス抑制因子として1957年に Issacs and Lindenman により発見, 命名され¹⁾, 1969年以来 Gresser ら^{2)~3)}により細胞増殖抑制因子として抗腫瘍性を有することが

明らかにされてきた。とくに1974年に Strander ら⁴⁾⁵⁾により, IFN の骨肉腫の肺転移抑制に関する臨床報告がなされるに及んで, IFN はウイルス性疾患の治療剤としてのみでなく, 悪性腫瘍の治療

剤としての可能性が急速に注目されるようになってきた。また一方では、1974年に Stöger⁶⁾, Talas (1974年, 1978年)ら^{7,8)}により IFN には放射線防護活性の存在が示唆される報告がなされており、放射線治療と IFN の併用療法をおこなう場合には、その併用の方法、条件について種々の検討が必要であると考えられた。本邦においては著者ら⁹⁾が1980年に Sarcoma 180細胞を用いて、放射線と IFN の併用効果について検討を加え、放射線照射を先におこない、後から IFN を投与するならばその併用効果を期待し得るが、IFN を先に投与して後から放射線照射をおこなう場合には、放射線の効果が減弱する可能性のあることを示唆する報告をしている。1981年に伊藤¹⁰⁾は KB 細胞を用いて、放射線と IFN の併用について若干の検討をおこなっているが、IFN の放射線防護活性に関しては言及していない。また Nederman¹¹⁾は1982年に human glioma cell line を用いて、放射線と IFN の併用効果は相加的であり、IFN は細胞の放射線感受性には影響を及ぼさないと報告しており、放射線と IFN の相互関係には不明な点が多く、放射線防護効果に関しても定かでない。そこでこれらの点を明らかにするために、IFN を併用した放射線の線量—効果関係について検討をおこなった。

材料および方法

実験には Sarcoma 180細胞の単一細胞浮遊液を作製して、これを用いた。これらの細胞を10% calf serum を含む MEM (Gibco, Grand Island, N.Y.) で、100cells/3ml となるように調整して、その3ml を径5cm のプラスチック・シャーレに接種した。

IFN はマウス由来の線維芽細胞である L-929 細胞を NDV (New castle disease virus) で誘発して作製したものであり、この IFN は、 α , β type の両者が含まれている。使用にあたっては pH 2 で処理して、ウイルスを不活性化して用いた。IFN は MEM で稀釈し、9,800U/ml となるように調整して、その0.5ml を各シャーレに添加、即ち1,400 U/ml となるように添加した。IFN の非投与群には MEM を0.5ml 添加した。

放射線はテレ・コバルト装置による γ 線 (線量率76R (Röntgen)/min) を用い、 γ 線の build up, 電子密度平衡を考慮し、シャーレの細胞接種面に所定の線量が照射されるように配慮して、一回照射をおこなった。照射線量は各実験群とも、100, 200, 300, 400, 500rad で、放射線照射単独群のみは600rad までおこなった。

実験方法はコロニー形成試験を用いて、放射線々量—効果曲線により、放射線、IFN の併用効果関係について検討をおこなった。シャーレに細胞を接種して8日目にコロニー数の算出をおこなった。8日目に算出した理由はコロニーが大きくなると融合したり、時には剝離したコロニーも出て判定に誤差が出るからである。算出にあたっては0.5%クリスタル・バイオレットにより固定染色をおこなって後に、十分に水洗してから判定した。コロニーは約0.5mm 以上のものを“+”と判定した。測定は各実験ともシャーレは5枚であり、そのコロニー数を計数し、平均値を算出して測定値とした。

結果

この実験における Sarcoma 180細胞のコロニー形成率 (PE) は48.8%であった。これらの細

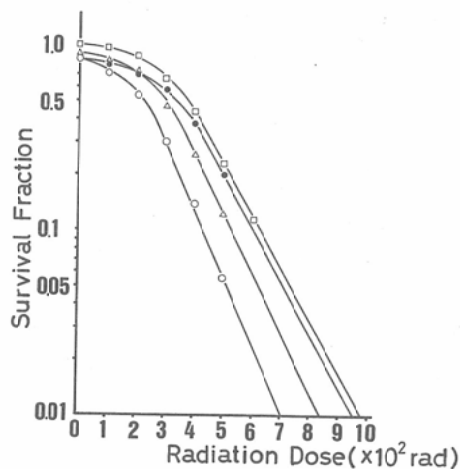


Fig. 1 Dose-survival curves of Sarcoma 180 cells after irradiation. These cells were cultured in 10% calf serum MEM and treated with radiation and interferon (IFN, 1,400U/ml) □, radiation alone; ○, radiation+IFN (24 H.); ●, IFN (24 H.)+radiation; △, radiation+IFN (192 H.).

Table 1 Effects of radiation treatment combined with interferon on Sarcoma 180 cells.
*, values of each parameter of these cells irradiated with 500 rads

Treatment	P. E. (mean±SD)	Survival rate	% Suppression
Non treatment	48.8 ±2.90	1.0	0
Radiation	11.7 ±0.58*	0.239*	76.02*
IFN (24 H)	41.0 ±2.70	1.0	15.98
Radiation + IFN (24 H)	2.67±0.57*	0.065*	94.53*
IFN (24 H) + Radiation	10.0 ±2.00*	0.244*	79.51*
IFN (192 H)	44.0 ±2.65	1.0	9.84
Radiation + IFN (192 H)	6.0 ±1.75*	0.136*	87.70*

胞のコロニーの形成を約16%抑制する量(1,400 U/ml)のIFNを放射線照射と併用して、投与時期、作用時間を変えて、その併用効果を検討した。Fig. 1に示す如く、放射線照射のみの対照群の生存率曲線に対して、放射線照射を先にしてからIFNを投与、その作用時間が24時間の実験群の生存率曲線は、そのコロニー形成がよく抑制されていることを示している。原点および500rad照射のコロニー形成率、生存率、%抑制率はTable 1に示す通りであり、 $p < 0.01$ の危険率で有意差を示している。しかしその併用効果が相加的であるのか、あるいは相乗的であるのかは不明であった。

これに対して、放射線照射の前にIFNを投与、その24時間作用後に照射した群の生存率曲線はFig. 1に示す如く、放射線単独の対照群とほぼ平行な、且つ全く有意差のない成績を示した。即ち放射線照射後IFN投与群と比較すると、そのコロニー形成抑制効果は著明に減少したこと示している。この実験群は、先に24時間IFNの作用を受けたのちに、IFNの細胞増殖抑制を受けたのちに照射されているので、IFNの抑制効果と放射線による抑制効果が重層して出現するはずであると考えられるが、結果としてIFNと放射線の併用効果はみられず、放射線単独の場合と同様な成績となった。このことはIFNを先に投与すると、細胞が放射線に対して抵抗性となることを示唆していると考えられた。

次に照射後にIFNを投与して、長時間、即ち192時間作用させた群では、Fig. 1に示すように、照射後IFN 24時間作用群に比較して、コロニー形成

抑制効果は減弱しており、その生存率曲線は照射のみの対照群と、照射後IFN 24時間作用群の中間の値を示した。即ち500rad照射の成績をみるとTable 1に示すとおり、%増殖抑制率は照射のみの対照群が76%、照射後IFN 24時間作用群が94.5%であるのに対して、照射後IFN 192時間作用群ではその中間の87.7%であった。そして対照群との間には $p < 0.01$ 、照射後24時間IFN作用群との間にも $p < 0.01$ の危険率で有意差が認められた。また照射されていない原点においても、Table 1に示すように、無処置群ではコロニー形成率(PE)が 48.8 ± 2.90 、IFN 24時間作用群では 41.0 ± 2.70 であり、IFN 192時間作用群はその中間の 44.0 ± 2.65 を示した。無処置対照群との間には $p < 0.01$ 、IFN 24時間作用群との間には $p < 0.07$ の危険率で有意差が認められた。即ち、IFNを長時間作用させると、IFNの細胞増殖抑制効果に拮抗する効果がIFNにより誘導されると考えられる結果が得られ、且つまたこの現象は照射されていない細胞より、照射された細胞により明確に観察された。

考 索

腫瘍細胞に対する放射線とIFNの併用効果とその併用条件について検討したところ、我々の用いた実験系では、IFNの投与を照射の前にするか、後にするかで大きな差のあることが示され、且つIFNの異なった活性が発現することが示された。

放射線照射をおこなった直後にIFNを投与すると、放射線の効果とIFNの細胞増殖抑制活

性²³⁾に基くコロニー形成抑制効果が重層して認められ、放射線単独群に対して $p < 0.01$ の危険率で有意差が認められた。即ち先に照射されて傷害を受けた腫瘍細胞が、さらにIFNの細胞増殖抑制作用を受けて一層そのコロニー形成能が阻害されるものと考えられた。しかし本実験ではその併用効果が相対的であるか、単なる相加的現象であるかは明らかにすることが出来なかった。

IFNを先に作用させて、後から放射線照射をおこなった場合には、放射線の効果が減弱し、IFNの作用により腫瘍細胞の放射線抵抗性が誘導されたと考えられた。即ちIFNで先に細胞を処理しておく、その細胞はIFNの細胞増殖抑制を受けると同時に放射線に対する感受性が低下することが示唆された。

IFNで処理された細胞は、その細胞周期のS期で H^3 -Tdrの摂取が減少しており¹²⁾¹³⁾、Fuse (1976, 1977)¹⁴⁾¹⁵⁾はIFNにより G_1 期からS期への移行が阻害されるとしている。即ちIFNで処理された細胞はS期でのDNA合成が低下し、またS期の細胞の減少がもたらされ、その結果として細胞の増殖が抑制され、同時にDNA合成抑制に基く放射線感受性の低下が出現するものと考えられた。したがって先に放射線照射された細胞は、放射線による傷害を受けており、特に亜致死傷害を受けている細胞はIFNによるDNA合成阻害を受けやすく、より一層細胞の増殖が抑制されたものと考えられた。また先にIFNの投与を行ない、あとから放射線照射された場合には、IFNの細胞増殖抑制と放射線抵抗性の誘導の二つの作用を同時に受け、結果的に放射線単独群と同様の成績を示すことになったものと考えられた。

この放射線抵抗性の誘導、放射線防護活性についてはStörger (1974)⁶⁾、Talas (1974)⁷⁾らも、*in vivo*でIFN誘発剤を使用した実験で認めている。特にTalasは1978年の報告⁸⁾で、マウスにIFN誘発剤を投与して血中のIFN濃度が最高となった時期に、マウスの全身照射をおこない、その延命効果を認めている。同時に脾細胞のコロニー形成試験をおこない、対照群と比較して、誘発剤投与群のコロニー形成率の増加も観察している。

しかし一方で、Nederman (1982)¹¹⁾はhuman glioma cell lineを用いたIFN投与後の照射実験で、cell growth, growth delayを観察して、IFNと放射線の併用効果は相加的であり、このような放射線防護活性の存在を認めていない。cell lineの相異、動物種の相異による検討が今後とも必要であることを示していると考えられた。

また我々の実験系では、IFNを長時間作用させると、IFNの細胞増殖抑制活性を減弱させる効果が認められ、放射線照射を伴う場合には特にその減弱効果が著明であった。このことは単にS期のDNA合成の低下あるいは抑制による細胞増殖抑制のメカニズム、放射線感受性の低下のみでは説明することは出来ない、Nederman (1982)¹¹⁾もIFN長時間作用下では、放射線照射されて低下したcell growthが2—3週間で回復することを観察している。そしてこの現象はIFN抵抗性細胞の存在、あるいはIFNに対する抵抗性の獲得によると考察しているが、彼らはIFNの短時間作用と長時間作用の比較検討をおこなっていない。我々の実験結果は、IFN 24時間作用によって受けた細胞増殖抑制効果を回復させるような活性が、IFNを長時間作用させることによって出現することを示している。そして先に放射線照射をおこなって後からIFNを投与した場合でも、IFNを長時間作用させると、上記の細胞増殖を抑制する効果と放射線防護活性の両者が出現してくるのではないかと考えられた。このような現象は、ただ単にIFN抵抗性細胞の存在、あるいはIFNに対する抵抗性の獲得のみでは説明が困難である。IFNであらかじめ細胞を処理しておく、その細胞の機能を亢進させたり、その生存を保護するような活性が出現することをTrinchieri (1978)¹⁶⁾、Sato (1979)ら¹⁷⁾が報告している。

IFNにはウイルス感染を阻止する活性、細胞とくに腫瘍細胞の増殖を抑制する活性、放射線防護活性の他にも、細胞の本来の機能を亢進させたり、あるいは細胞の生存にとって保護的に働くStabilizer様の活性が存在するとすれば、IFNは誠に興味深い物質であるといわなければならない。このような種々な活性を持った生物活性物質

と放射線の併用効果については、相互に及ぼす作用、影響に関して、cell line, 動物の相異のみでなく作用条件の相異による詳細な検討が *in vitro*, *in vivo* ともに、今後とも必要であると考えられた。

結 論

Sarcoma 180細胞を用いて、放射線照射とIFNの併用効果について検討をおこなった。

1) 放射線照射を先におこない、後からIFNを投与するならば著明な腫瘍細胞の増殖抑制効果、併用効果が得られた。しかしその併用効果は相乗的であるか、相加的であるかを明らかにすることは出来なかった。

2) IFNを先に投与して、後から放射線照射をおこなうと、IFNにより放射線の効果が減弱すること、即ちIFNの放射線防護活性が認められた。

3) IFNを長時間連続作用させると、IFNの細胞増殖抑制効果を逆に減弱させる拮抗的な効果が出現し、この効果は照射されていない細胞より、照射された細胞においてより顕著に認められた。

(本研究は文部省科研費による研究の一部である。)

文 献

- 1) Isaacs, A. and Lindenmann, J.: Virus interference. 1. The interferon. *Proc. Roy. Soc. Ser. B*, 147: 258-267, 1957
- 2) Gresser, I.: Interferon and cancer: Therapeutic prospects. *Rev. Eur. Etud. Clin. Biol.*, 15: 23-27, 1969
- 3) Gresser, I. and Bourali, C.: Antitumor effects of interferon preparations in mice. *J. Nat. Cancer Inst.*, 45: 365-376, 1970
- 4) Strander, H., Cantell, K., Jakobsson, P.A., Nilsson, U. and Soderberg, G.: Exogenous interferon therapy of osteogenic sarcoma. *Acta. Orthop. Scand.*, 45: 958-959, 1974
- 5) Strander, H.: Treatment of human osteogenic sarcoma with interferon. *Proceeding of International Workshop on interferon in the Treatment of Cancer, New York, 1975*, pp. 39-49
- 6) Stöger, I., Szolgay, E. and Talas, M.: Interferon Inducers as possible protecters of haemopoietic system in proton and X-irradiated mice. In: *Interferon and Intergern Inducers*. pp. 195-203(Proceeding of Interferon Inducers. Tihany, Hungary, Sept., 1974). *Microb. Res. Group of the Hung. Acad. Sci. Budapest*, 1975
- 7) Talas, M., Savchenko, N. Ja., Shein, V.I., Fedorenko, B.S., Ryzhov, N.I. and Konstantinova, I.V.: Influence of interferon inducers on the progress of radiation disease in mice irradiated with high energy protons. *Radiobiologica (Moscow)*, 14: 237-241, 1974
- 8) Talas, M. and Szolgay, E.: Radioprotective activity of interferon inducers. *Archives of Virology*, 56: 309-315, 1978
- 9) 三好武美, 李 富夫, 有水 昇: Sarcoma180細胞におけるインターフェロンの放射線照射に及ぼす修飾効果. *医学のあゆみ*, 112: 526-528, 1980
- 10) 伊藤秀源: 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*). *日本医学放射線学会雑誌*, 41: 551-558, 1981
- 11) Nederman, T. and Benediktsson, G.: Effects of interferon on growth rate and radiation sensitivity of cultured human glioma cells. *Acta. Radiologica Oncology*, 21: 231-234, 1982
- 12) O'Shaughnessy, M.V., Lee, S.H.S. and Rozee, K. R.: Interferon inhibition of DNA synthesis and cell division. *Canad. J. Microbiol.*, 18: 145-151, 1972
- 13) Lundblad, D. and Lungren, E.: Block of a glioma cell line in S by interferon. *Int. J. Cancer*, 27: 749-754, 1981
- 14) Fuse, A. and Kuwata, T.: Effects of interferon on the human clonal cell line, R5a: Inhibition of macromolecular synthesis. *J. Gen. Virol.*, 33: 17-24, 1976
- 15) Fuse, A. and Kuwata, T.: Inhibition of DNA synthesis of synchronized R5a cells by human leukocyte interferon. *J. Natl. Inst.*, 58: 891-896, 1977
- 16) Trinchieri, G. and Sanoli, D.: Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antigenic inhibition of susceptibility of target cells to lysis. *J. Exp. Med.*, 148: 1314-1332, 1978
- 17) Sato, T., Fuse, A. and Kuwata, T.: Enhancement by interferon of natural cytotoxic activities of lymphocytes from human cord blood and peripheral blood of aged persons. *Cell. Imm.*, 45: 458-463, 1979