The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	腫瘍への局所X線照射による抗腫瘍効果に対する免疫賦活剤の効果-2.マウスインターフェロン-α/β-
Author(s)	迎, 史郎; 法村, 俊之; 土屋, 武彦
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1988, 48(10), p. 1243-1248
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19382
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

日本医放会誌：48（10），1243—1248，1988（昭63）

腫瘍への局所X線照射による抗腫瘍効果に対する免疫賦活剤の効果
—2. マウスインターフェロン-α/β—

産業医科大学放射線衛生学教室
迎　史郎　法村　俊之　土屋　武彦

（昭和62年12月3日受付）
（昭和63年4月22日最終原稿受付）

Effect of Immunomodifier on Radiation-Induced Antitumor Immunity Following Local Irradiation to Tumor
—2. Mouse Interferon-α/β—

Shiro Mukae, Toshiyuki Norimura and Takehiko Tsuchiya
Department of Radiation Biology and Health, University of Occupational and Environmental Health, Japan

Reserach Code No. : 407

Key Words : Mouse interferon-α/β, Local irradiation, Radiation-induced immunity

This study was carried out to clarify whether or not the antitumor cell-mediated immunity of host is more effectively induced by the combined use of mouse interferon-α/β (MuIFN-α/β) with local irradiation than by simple local irradiation to tumor.

C3H/He female mice, MM46 tumor cells and mouse interferon-α/β (MuIFN-α/β) were used in the experiment.

Antitumor activity in mice was evaluated by the inhibition of tumor growth and mean survival days after treatment. Spleen cell killing activity to MM46 tumor cells was measured to evaluate the antitumor activity in vitro.

In the case of single use of MuIFN-α/β, tumor growth was more rapid than in the non-treated group (control) in vivo. The mean survival days were also reduced.

There was no significant difference in tumor growth inhibition between combined therapy using X-irradiation and MuIFN-α/β, and single therapy by local irradiation. However, in the case of administration of MuIFN-α/β after irradiation, the mean survival days was significantly increased compared with the group receiving X-ray irradiation only.

緒　言

放射線の腫瘍に対する作用には宿主免疫能の関与も重要な役割を果たしていることを土屋らは報告している[1)~4)]．筆者らはさらに放射線照射の抗腫瘍効果への宿主免疫系の修飾についての研究を行い，X線とOK-432の併用の場合，drug-irradiation intervalの違いによって抗腫瘍効果が大きく異なることを報告した[5)]．

今回はimmunopotentiatorとしてマウスインターフェロン-α/β（以下MuIFN-α/β）を用い，放射線との併用効果を調べ，併用の場合放射線照射単独に比べて，有意な延命効果，完全消退率の

上昇を得たので報告する．

材料及び方法

(1) 実験動物及び腫瘍

C3H/He マウス（雌，10～12週齢）を用い，in vivo 実験用マウスはプラスチック製1匹飼育用ケージ，in vitro 実験用マウスはアルミ製10匹飼育用ケージに各群毎に分けた．

腫瘍は同系腫瘍である C3H マウス自然発生乳癌由来の MM46細胞を用いた．MM46細胞は免疫学的には腫瘍関連移植抗原である MM 抗原を持った抗原性の高い腫瘍である．

in vivo 実験では腹腔内にて継代培養したものを用い，これをマウス左大腿部に 2×10^6個/mouse の細胞を皮下移植した．in vitro 実験では10%fetal calf serum（FCS）加 RPMI1640を培養液とし，in vitro 継代培養した MM46細胞を用いた．

(2) X 線照射法

管電圧250kVp，管電流12mA，0.5mmCu+1.0 mmAl フィルターを用い，線量率42.7R/min の条件で照射した．Pentbarbital（0.01mg/g）の腹腔内投与にて麻酔し，鉛製の照射用ボックスに固定し，左下肢以外を鉛で完全に覆い20Gy の1回照射を行った．なおいずれの実験も腫瘍移植より9日目に X 線照射を行った．

(3) 薬剤投与法

MuIFN-α/β は1×10^5IU/ml に調整したものをマウス腹腔内へ1回0.2ml（2×10^4IU/mouse）ずつ Fig. 1に示したスケジュールに従って投与した．

Exp. 1は MuIFN-α/β の1回投与と3回投与の効果を調べるための実験で R+IFN は X 線照射直後の1回投与群を示し，R+3IFN は照射直後，24時間後，48時間後の3回投与群である．また IFN，3IFN は MuIFN-α/β の単独投与群を示しそれぞれ R+IFN，R+3IFN と同時に投与した．

Exp. 2で3IFNb+R は X 線照射48時間前，24時間前，直前の3回投与群で3IFNb は単独投与群で3IFNb+R と同時に投与した．R+3IFNa は照射直後，24時間後，48時間後の3回投与群で単独投与群である3IFNa も同時に投与した．

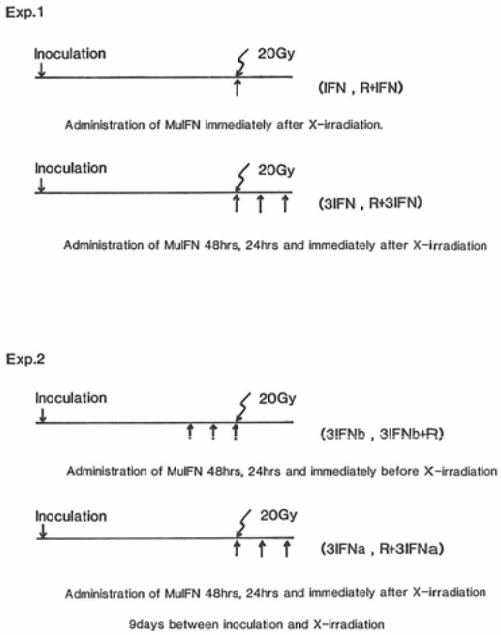

Fig. 1　Schema of administration methods of MuIFN

(4) 腫瘍増殖抑制実験（in vivo）及び平均生存日数

マウスは1群7～10匹とし各マウスについて腫瘍移植後経時的にキャリパーにて腫瘍の縦径と横径を測定し，その積を求め，X 線照射日の値で除した値を relative size とし，腫瘍増殖の程度を評価した．また Exp. 2では complete regression を示したマウス以外を死亡するまで飼育し腫瘍移植の日より死亡日までを生存日数とし平均生存日数を求めた．

(5) in vitro 中和実験

Exp. 2の各群マウスの MM46細胞に対する脾細胞活性を前報[5]に示した方法にて求めた．

24穴 multi-well plate を用い，第1列目に target cell として MM46細胞（5×10^4個/ml）1ml を加え，effector cell として各群マウスの脾臓を摘出し，10%FCS 加 RPMI1640中でピンセットにより細胞を取り出し，ステンレスメッシュを通して得た脾細胞を 1×10^7/ml に調整し1ml を上記の target cell に加え（E/T=200），5%CO_2，37℃

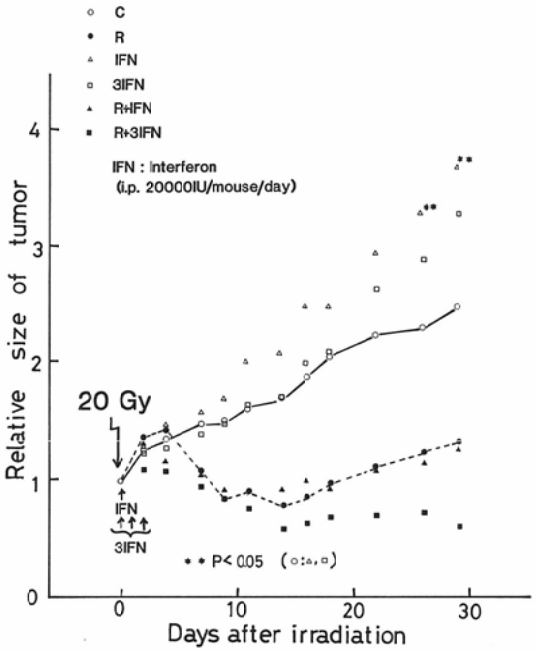

Fig. 2　Comparison of tumor growth in mice treated with MuIFN and/or tumor irradiation (Exp.1)

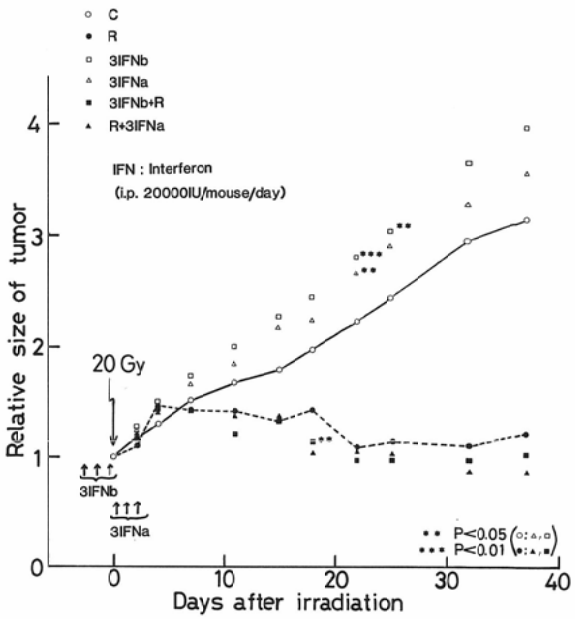

Fig. 3　Comparison of tumor growth in mice treated with MuIFN and/or tumor irradiation (Exp. 2)

にて48時間培養した後3，4列目にあらかじめ加えておいた10%FCS 加 RPMI1640 2ml に1列目の混合培養浮遊液0.2ml を加えさらに72時間培養した後，target cell 数をセルカウンターで計算し次式のように relative spleen cell activity を求めた．

$$\text{Relative spleen cell activity} = \frac{\text{target cell number with normal mice spleen cells} - \text{target cell number with immune mice spleen cells}}{\text{target cell number with normal mice spleen cells} - \text{target cell number with control mice spleen cells}}$$

target cell : MM46 tumor cell

これらの操作は腫瘍へのX線照射後1週間目より4週間目まで1週間毎に行った．

結　果

(1) 腫瘍増殖抑制実験

Exp. 1　Fig. 2に示す実線がコントロール群(腫瘍移植のみで未処置)を示し，インターフェロンの単独投与はコントロール群よりも腫瘍増殖が早い傾向を示した．併用の場合1回投与（R+IFN）ではX線照射のみと腫瘍増殖に差が認められなかったが，3回投与（R+3IFN）ではX線照射単独群（破線）よりも腫瘍が縮小する傾向がみられた．

Table 1　Effect of MulFN on tumor growth and mean survival days

Treatment	Complete regression	Mean survival days
C	0/7	87.4±13.8
R	2/9	99.1±18.6
31FNb	0/8	79.8±19.0
31FNa	0/9	80.9±14.5
31FNb+R	3/10	114.7±12.4
R+31FNa	4/9	140.6±29.0

R: X-irradiation only. 31FNa, 31FNb: single use of MulFN 31FNb+R, R+31FNa: combined treatment with MulFN and X-irradiation

Exp. 2　Exp. 1の結果によりインターフェロンの投与を3回としX線照射前投与と後投与の群に分けたもので，Fig. 3に示すように単独投与群は3IFNb，3IFNa共にコントロール群(C)に比べ腫瘍増殖が促進される傾向がみられた．この傾向はExp. 1でも同様であった．

併用群とX線照射単独群を比べた場合，有意差を認めなかったが，やや併用群(3IFNb+R，R+

Table 2　T-test of every group of mean survival days

	C	R	31FNb	31FNa	31FNb+R	R+31FNa
C	—	N.S.	N.S.	N.S.	p<0.005	p<0.005
R	N.S.	—	N.S.	N.S.	N.S.	p<0.025
31FNb	N.S.	N.S.	—	N.S.	p<0.005	p<0.005
31FNa	N.S.	N.S.	N.S.	—	p<0.001	p<0.001
31FNb+R	p<0.005	N.S.	p<0.005	p<0.001	—	N.S.
R+31FNa	p<0.005	p<0.025	p<0.005	p<0.001	N.S.	—

Table 3　Effect of MulFN on spleen cell activity

Treatment	Relative spleen cell activity			
	7*	14*	21*	28*
R	0.97	0.28	1.32	1.19
31FNb	1.34	1.08	1.22	1.21
31FNa	1.32	1.40	1.15	1.30
31FNb+R	1.22	1.40	1.17	0.96
R+31FNa	1.33	1.48	1.22	1.02

X*=X days after irradiation

3IFNa）の方がX線照射単独に比べて腫瘍増殖抑制が強い傾向を認めた．

(2) 平均生存日数

Table 1に各群のcomplete regression，平均生存日数を示しTable 2に各群の平均生存日数のT検定の結果を示した．

Table 1に示したようにcomplete regressionを示した群はいずれもX線照射を行った群で，特に照射後3回投与群（R+3IFNa）が9匹中4匹にcomplete regressionを示し平均生存日数も140.6±29.0日と最長を示した．これはX線照射単独の99.1±18.6日と比べ有意（$p<0.025$）な延長を示した．

コントロール群（C）とインターフェロン単独使用群（3IFNa，3IFNb）を比べた場合，単独使用群はいずれも生存日数は短縮したが有意ではなかった．またコントロール群とX線照射単独群の間にも平均生存日数には有意差はみられなかった．コントロール群と併用群を比べた場合はいずれも併用群が有意な生存日数の延長を示した．

インターフェロン単独使用群と併用群を比べた場合もいずれも併用群が有意な生存日数の延長を認めた．

(3) in vitro 中和実験

Table 3に示したように併用群（3IFNb+R，R+3IFNa）はX線照射14日後に最高の活性を示し以後減少しX線照射単独と差がみられなくなった．

インターフェロンの単独使用群（3IFNb，3IFNa）は経過中比較的高い活性を維持し28日後にはむしろ併用群より活性は高く，in vivoのデータとの一致が見られなかった．

考　察

インターフェロンは極めて多面的な生物活性を示す蛋白質である．

1957年にウイルス増殖抑制因子として発見されたが[6]，その後の活発な研究により細胞増殖抑制作用[7]，NK細胞の活性化[8]，マクロファージの貪食能亢進[9]，ADCC活性増進作用等[10]が報告されている．

また臨床応用の報告も多く，放射線治療との併用についての報告もみられている[11]．

しかし，その投与法については未だ試行錯誤の状態と言わざるを得ない．

今回の研究はX線照射とインターフェロンを併用することによりX線照射の効果が増強されるか否か，またどのような投与法がより抗腫瘍効果を高めるかを検討するのが目的であった．

インターフェロンのみの投与でみるとFig. 2，Fig. 3に示したようにExp. 1，Exp. 2共に未処置群よりも腫瘍増殖が促進されている．またTable 1に示したようにコントロール群とインターフェロン投与群に平均生存日数に差は見られず，むしろコントロール群の方が生存日数が長い傾向がみられ，インターフェロンの単独投与は腫瘍増殖に対して無効であった．

しかしin vitroで作用させた場合，Table 3に

示したようにspleen cell activityでは明らかにMM46細胞に対して増殖抑制を示しており，インターフェロン単独投与群もコントロール群に比べ高い値を示している．

インターフェロンの抗腫瘍作用抑制についてはいくつかの報告がみられTrinchieriらはtarget cellをインターフェロン処置するとNK細胞によるtarget cellの障害に抵抗性が出現することを報告している[12]．またBergeretらはKiller T cellによるtarget cell障害においてもインターフェロンによる抵抗性が出現することを報告しており[13]，いずれもインターフェロンによるtarget cell表面構造の変化によるものとしている．さらにBorgströmらはインターフェロンによるsuppressor T cellの活性化により抗腫瘍効果が低下すると報告している[14]．マクロファージに関してはT cellに対する抗原提示能を誘導しないという報告[15]があり，B cellの抗体産生に対しても抑制する[16]とする報告が多い．

in vitro中和実験で用いたtarget cellはインターフェロンとはまったく接触しておらず，活性化された脾細胞に対して抵抗性を持たない．一方in vivoの場合腹腔にインターフェロンが投与されており，左大腿部に移植された腫瘍はインターフェロンと接触しており，免疫細胞に対して抵抗性を持つと考えると今回の結果は前記の報告を支持するものであろう．またこの事がインターフェロンの単独使用においてin vivoとin vitroの結果に一致を見なかった原因の1つであると考えられる．

X線との併用群についてみると腫瘍サイズではX線単独照射群とインターフェロン併用群の間には有意差はみられなかったが，平均生存日数ではTable 1，2に示すようにX線照射単独に比べて照射後3回投与群（R＋3IFNa）は有意（$p<0.025$）に生存日数が延長し，complete regressionの割合も高かった．

インターフェロンは血中半減期が数十分であることから直接効果発現のためにはその有効血中濃度維持が必要である．この点についてin vitroでインターフェロンを除くと腫瘍の再増殖がみられることは確認されており[17]，in vivoでもShimoyamaらがヌードマウス系で1×10^8IU/kgの量を単回投与しても無効だがその1/10量の1×10^7IU/kgを10日間連続投与すると延命効果が得られたと報告している[18]．したがって今回のような1～3回投与では直接作用は期待できず，むしろ前述の宿主依存性抗腫瘍作用抵抗性，すなわち抗抗腫瘍効果が前面に立ち今回のような腫瘍増大につながると考えられる．しかしこの抗抗腫瘍効果を除けばspleen cell activityの上昇からもわかるように宿主免疫能は活性化されており抗腫瘍効果を発揮させることができる．X線との併用で抗腫瘍効果が増したことから，その役割をX線照射がはたしたことになる．

放射線の局所照射により宿主免疫能は賦活化されることは証明されており，その機序の中には腫瘍細胞表面抗原の変化による抗原提示能の上昇，suppressor T cellの抑制も含まれており今回の結果を示唆するものである．

このように現段階ではインターフェロンの効果が必ずしも一定していないが，これは投与法，投与量の問題が大きく関連していると思われ今後さらに検討する必要があろう．

またインターフェロンには放射線の骨髄障害を防護する作用がありlethal irradiationの後に投与した場合著明な延命効果を示すという報告もみられる[19]．したがって放射線治療における免疫系細胞の重要性，ならびにそれらの放射線に対する高感受性という観点から，造血系の放射線障害の防護効果という面からの検討も必要であろう．

結　論

X線とMuIFN-α/βの併用効果を検討した．

担癌マウスに対してMuIFN-α/βを単独で投与した場合，コントロール群よりも腫瘍は増大し抗腫瘍効果を示さなかった．X線局所照射に併用した場合は，X線照射単独に比べて併用群はX線照射前投与，後投与共に腫瘍増大度に差を認めなかったが，生存日数では照射後投与の場合，照射単独に比べ有意に延長した．

マウスインターフェロンを供与下された京都バスツール研究所理事長兼所長，京都府立医科大学名誉教授岸田綱太

郎先生，ならびに神戸常盤短期大学喜多先生に深く感謝いたします．

また本実験で協力を受けた放射線衛生学教室の二陛堂，白木さんに感謝いたします．

なお本研究の一部は文部省科学研究費課題番号59480447によった．

文　献

1) 土屋武彦：局所照射における免疫作用の役割．1．抗腫瘍細胞性免疫について，日本医放会誌，36：922—929, 1976

2) Tsuchiya T, Norimura T, Okamoto M: Cell mediated immunity in host after tumor irradiation. J Radiat Res 24: 345—355, 1983

3) 土屋武彦：放射線治療における免疫機能の関与，癌の臨床，29：1499—1505, 1983

4) Kurata S, Tsuchiya T, Norimura T, et al: Evidence for cytostatic T cell activtity in the effector mechanism against syngenic TMT mammary cells in mice. J Immunol 130: 496—500, 1983

5) 迎　史郎，法村俊之，土屋武彦：腫瘍への局所X線照射による抗腫瘍効果に対する免疫賦活剤の効果—1．OK-432—，日本医放会誌，47：838—844, 1987

6) Isaacs A, Lindenmann J: Virus interference 1. The Interferon. Proc Roy Soc Ser B 147: 258, 1957

7) Strander H, Einhorn S: Effect of human leukocyte interferon on the growth of human osteosarcoma cells in tissue culture. Int J Cancer 19: 468—473, 1977

8) Kirchner H, Hirt HM, Becker H, et al: Production of an antiviral factor by murine spleen cells after treatment with corynebacterium parvum. Cell Immunol 31: 172—176, 1977

9) Yoshie O, Mellman IS, Broeze RJ, et al: Interferon action: Effects of mouse α and β interferons on rosette formation, phagocytosis, and surface-antigen expression of cells of the macrophage-type line RAW 309Cr. 1. Cell Immunol 73: 128—140, 1982

10) Ullberg M, Jondal M: Antibody and interferon-dependent killer cells are part of the NK cell receptor positive subpopulation of human peripheral blood cells. Clin Exp Immunol 53: 101—108, 1983

11) Holsti LR, Mattson K, Niiranen A, et al: Enhancement of radiation effects by alpha interferon in the treatment of small cell carcinoma of the lung. Int J Radiation Oncology Biol Phys 13: 1161—1166, 1987

12) Trinchieri G, Santoli D: Antiviral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibity of target cells to lysis. J Exp Med 147: 1314—1333, 1978

13) Bergeret M, Fouchard M, Gregoire A, et al: Interferon effect on cytolytic T lymphocytes in a single cycle assay. Immunol 48: 101—106, 1983

14) Borgström S, Flodgren P, Axelsson B, et al: Human leukocyte interferon and cimetidine for metastastic melanoma. N Engl J Med 307(17): 1080—1081, 1982

15) Zlotnik A, Shimonkevitz RP, Gefter ML, et al: Characterization of the γ-interferon-mediated induction of antigen-presenting ability in P388D1 cells. J Immunol 131(6): 2814—2820, 1983

16) Gisler RH, Lindahl P, Gresser I: Effects of interferon on antibody synthesis in vitro. J Immunol 113(2): 438—444, 1974

17) Ida N, Uenishi N, Kajita A, et al: Autitumor effect of human fibroblast interferon on the growth of human melanoma cells implanted in nude mice. Gann 73(6): 952—960, 1982

18) Shimoyama M: The clinical potential of interferons. 東京大学出版会，p213, 1982

19) Ortaldo S, McCoy J: Protective effects of interferon in mice previously exposed to lethal irradiation. Radiat Res 81: 262—266, 1980