

Human Tumor Clonogenic Assay を用いた 各種インターフェロンに対する泌尿器腫瘍の感受性の検討

山口大学医学部泌尿器科学教室（主任：酒徳治三郎教授）

松 山 豪 泰

THE IN VITRO ASSESSMENT ON VARIOUS TYPES OF INTERFERONS FOR UROLOGICAL TUMORS BY THE HUMAN TUMOR CLONOGENIC ASSAY

Hideyasu MATSUYAMA

From the Department of Urology, School of Medicine Yamaguchi University

(Director: Prof. J. Sakatoku)

The direct antitumor effects of various types of interferons (IFNs) were compared against urological malignancies, in particular the renal tumor using the human tumor clonogenic assay (HTCA).

The concentrations of each IFN were 50 and 500 IU/ml, respectively, and the exposure time was continuous (2~4 weeks). IFN α A, β , γ , (recombinant type) and α (human lymphoblastoid type) were investigated in 37 specimens of urological primary tumors. Each tumor was judged to be sensitive to IFN by 70% colony inhibition when compared to the colonies of the controls. Eight (22%) of the 36 trials were sensitive to IFN. On the other hand, 3 cases (8%) were augmented cases defined as a colony increase of more than two times the standard error of control colony growth. The renal tumor had a tendency to be more sensitive to IFN than the other urological tumors ($P < 0.1$). The order of the colony inhibition against the renal tumor was IFN $\gamma > \alpha > \alpha$ A, β . This order was statistically significant ($P < 0.025$, Wilcoxon's tets). These results corresponded with the results reported by others. We recommend the HTCA as an adequate method for assessing the direct antitumor effect of IFN.

Key words: Clonogenic assay, IFN, Urological tumors, Augmentation

緒 言

泌尿器腫瘍には治療が困難なものが少なくないが、なかでも腎癌は化学療法がほとんど無効であり進行症例や腎摘術後の再発例に対しては有効な治療手段を持たないのが現実である。

しかし近年インターフェロン（以下 IFN と略す）が抗腫瘍効果を有することが報告され¹⁾、腎癌に対してもある程度の有効性が認められることが phase II

study の結果から明らかになった²⁾。

そこでわれわれは腎癌を含めた泌尿器腫瘍に対する各種 IFN の *in vitro* における感受性試験を Salmon & Humburger らの開発した human tumor clonogenic assay (HTCA)³⁾ を用いて行ない、次の点について検討を行なった。

①腎腫瘍における各種 IFN 間の感受性の比較。

②腎腫瘍とその他の泌尿器腫瘍の IFN に対する感受性の比較。

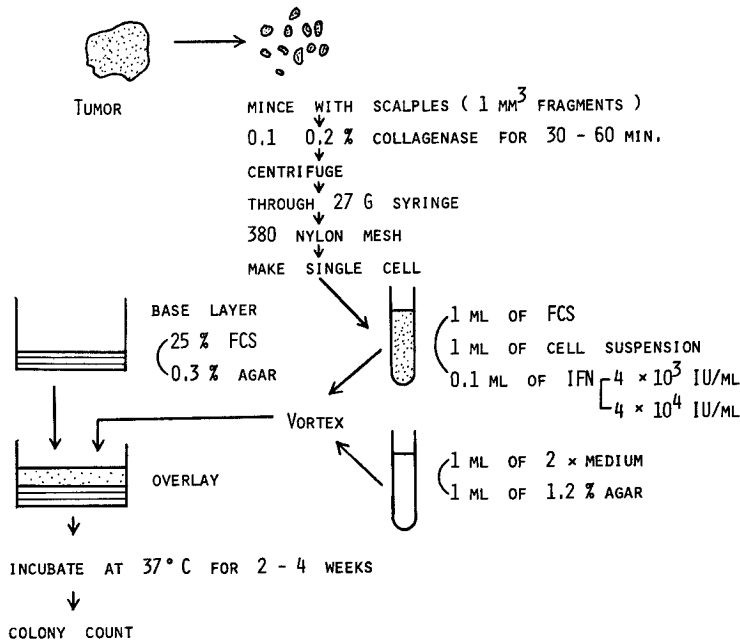


Fig. 1. Methods of the HTCA

Table 1

IFN α	; HUMAN LYMPHBLASTOID INTERFERON (MOR-22) (MOCHIDA)
IFN αA	; RECOMBINANT INTERFERON (Ro 22-8181) (JAPAN ROCHE)
IFN β	; RECOMBINANT INTERFERON (GKT- β) (KYOWA HAKKO)
IFN γ	; RECOMBINANT INTERFEPEON (TRP-2) (JAPAN ROCHE)

③ IFN の感受性の差による各症例の分類.

対象および方法

1. 研究方法

当科で行なっている HTCA の方法は Salmon らの原法をさらに簡便にしたものである (Fig. 1). まず無菌的に採取した検体をメス先またはハサミを用いて約 1 mm³ 以下に細切後, 0.1~0.2 collagenase (Sigma 社, Type Ia) とともに 30~60 分間 37°C 温浴槽中で攪拌後, ガーゼメッシュを通過させ, 遠沈洗浄を 2 回繰り返す, 1×medium (Flow laboratories, Dulbecco's MEM) に再浮遊させたものをガラスウール, 27 gage 注射針の順に通過させ, single cell suspension を作成した. さらにディッシュに播種

直前に 380 ナイロンメッシュを通過させて, 可能な限り cell aggregation を除去した. また viability のチェックには 0.43% トリパン青で染色されない有核細胞を生細胞として判定し, 播種細胞数が 1~5×10⁵ cell/dish となるように調整した.

Base layer の作成には 1×medium, 2×medium, 仔牛血清 (以下 FCS と略す, Flow laboratories 社, ロット番号 896), 1.2% agar (Difco 社) を等量ずつ加え, 寒天濃度および FCS 濃度がそれぞれ 0.3%, 25% となるように調整した後, 35 mm グリッド付プラスチックディッシュ (Lux 社, Lux 5217) に 1 ml ずつすばやく分注した.

Top layer は 2×medium, FCS, 1.0% agar, 先に作成した single cell suspension を各々 1 mm ずつ加え, さらに IFN を加えた後, 3 枚のディッシュの base layer 上に 1 ml ずつ重層させた.

使用した各種 IFN は, ①ヒトリンパ芽球性 α 型 IFN (以下 α と略す, MOR-22), ②ヒト遺伝子組換 α 型 IFN (以下 αA と略す, Ro 22-8181), ③同 β 型 IFN (以下 β と略す, GKT- β), ④同 γ 型 IFN (以下 γ と略す, TRP-2) の 4 種類である (Table 1), なお IFN は 25% FCS, 10 mM hepes buffer を含む 1×medium (NaHCO₃ を含まない) を用いて 4×10³ および 4×10⁴ IU/ml に溶解後 -80°C で凍結保存し, HTCA の直前に溶解して使用した.

各ディッシュは5% CO₂, 37°C incubator 内で2週間以上培養した。また原則としてコントロール(対照群)は6枚, cell aggregation を検定する positive control は10%ホルマリンで固定したものをを用いた。

II. 判定方法

コロニーカウントは2~4週間培養後, 倒立位相差顕微鏡下で行ない, 直径60 μm 以上, 細胞数30個以上で構成される細胞集団をコロニーと判定した。なおカウントに際しては, 先に作成した positive control のコロニー数を cell aggregation として各ディッシュのコロニー数より差し引いて算定した。

感受性の判定については2つの観点より判定基準を設定した。まず対象群コロニー数に比べ50%以上の抑制または70%以上の抑制を示す症例を有効と判定した。また IFN 濃度については top layer が 10² または 10³ IU/ml となるように調整しているが IFN の base layer への移行があり, 最終的には 50 または 500 IU/ml となる。これらの濃度は臨床的に到達しうる血中濃度であり^{2,4)}, 前者を低濃度接触群, 後者を高濃度接触群とし, 2群について検討した。

III. 対象および検体

対象とした症例は1982年2月より1984年12月までに当科およびその関連病院で得られた泌尿器腫瘍であり, 原則として手術摘出後, できるだけ早く検体として供した。

実験に先立って寒天中の各種 IFN の経時的な力価の変動を検討するため IFN 製造各社に依頼して寒天培地作成直後, 24時間後, 3日後, 7日後, 14日後の5点で Bioassay 法を用いて力価を測定した (Fig. 2)。

Fig. 2 は培地作成直後の力価を100%としたときの各時間の力価をプロットしたもので抽出率は70~90%であった。その結果, ① top layer 中の IFN は重層直後より base layer へ移行し, 等濃度で平衡状態に達する。すなわち top layer 中で 10² IU/ml に調整しても力価の変動とは関係なく 50 IU/ml となる。② β および γ は力価の減衰が急速で24時間後に30~60%, 1週間後に5~10%に低下する。しかし, α および α A は減衰が緩徐であり1週間後でも約70%以上の力価が残存している。③ α および α A の寒天中の力価の減衰は培養液中の減衰より緩徐である(資料未発表)。以上の結果をふまえ, 感受性試験の結果の検討を行なった。

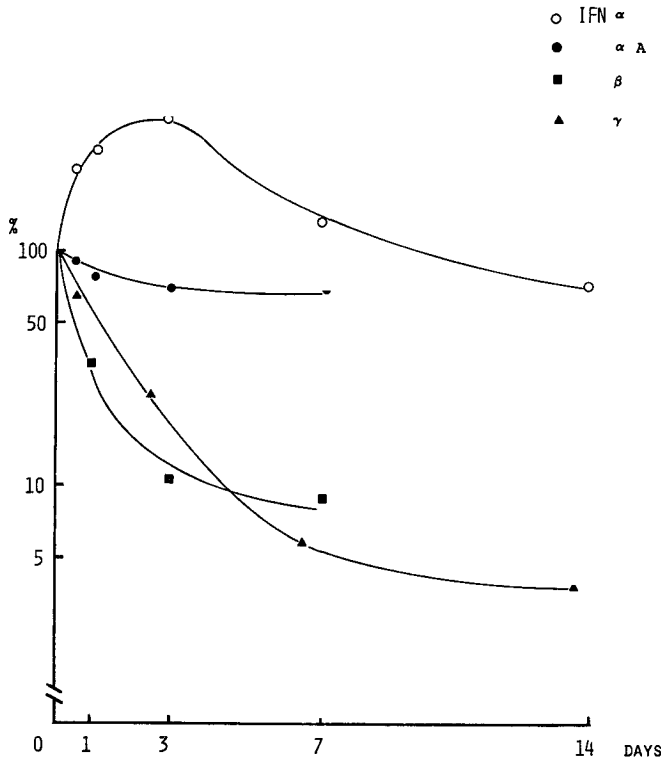


Fig. 2. The activities of various types of IFNs in the agar.

Table 2. The results of the HTCA against urological tumors.

TUMOR TYPE	No. OF TRIAL	SUFFICIENT GROWTH* FOR DRUG TESTING (%)	MEAN P.E.**	MEAN NO. OF COLONIES (RANGE)
RENAL	22	11 (50%)	0.085	49 (30-84)
OTHERS	15	6 (40%)	0.198	243 (38-686)
BLADDER	5	1 (20%)		
URETERAL	3	2 (67%)		
TESTICULAR	4	1 (25%)		
RETROPERITONEAL	3	2 (67%)		
TOTAL	37	17 (46%)	0.125	117 (30-686)

* : MORE THAN 30 COLONIES / DISH

** : PLATING EFFICIENCY

Table 3. The results of the HTCA against urological tumors.

	No. OF TRIAL	SUFFICIENT GROWTH FOR DRUG TESTING (%)	MEAN P.E.	MEAN NO. OF COLONIES (RANGE)
PRIMARY LESION	30	12 (40%)	0.122	130 (30-686)
METASTATIC LESION	7	5 (71%)	0.133	108 (31-237)

結 果

Table 2 は腎腫瘍およびその他の泌尿器腫瘍の内訳およびコロニー形成能を比較したものである。施行された HTCA のうち、感受性試験の判定が可能な症例 (1 ディッシュあたり30個以上のコロニー形成のみられたもの) は全体で37例中17例 (46%)、腎腫瘍は22例中11例 (50%)、その他の泌尿器腫瘍は15例中6例 (40%) であった。その他の泌尿器腫瘍を臓器別に分類すると膀胱5例、尿管3例、睾丸4例、後腹膜腫瘍3例であった。また腎およびその他の泌尿器腫瘍を原病巣と転移巣に分けて分類すると、原病巣は30例 (81%) を占め、判定可能症例は30例中12例 (40%) であったが、転移巣は7例 (19%) で、判定可能症例は7例中5例 (71%) と高率であった。また平均コロニー形成能 (mean plating efficiency : P.E.) は腎腫瘍 0.085%, その他 0.198%, 平均コロニー数は腎腫瘍 49, その他 243 であった (Table 3)。

1. 各種 IFN 間の感受性の比較

Fig. 3 は各種 IFN に対する腎腫瘍の感受性を低濃度接触群と高濃度接触群で比較したものである。

70%以上のコロニー抑制を有効としたとき (Fig. 3

(B)), 低濃度群と高濃度群で感受性の差を比較すると αA および α は接触濃度による感受性の差はみられないが, β および γ では高濃度群ほど感受性が高く, 濃度依存性を示す結果が得られた。同様の傾向が Fig. 3(A) においてもみられた。

次に同じ α 型ではあるが製造方法の異なる α と αA の感受性を統計学的に比較したところ α は αA より有意に ($P < 0.025$, Wilcoxon 検定) 感受性が高く, さらに4種類の IFN を比較したとき, $\gamma > \alpha > \alpha A$, β の順で有意に ($P < 0.025$) 感受性が高かった。

II. 腎腫瘍とその他の泌尿器腫瘍の INF に対する感受性の比較

Fig. 4 は腎腫瘍とその他の泌尿器腫瘍の感受性の差を比較したものである。その結果, 低濃度接触群, 高濃度接触群とも腎腫瘍はその他の泌尿器腫瘍に比べ IFN に対する感受性が高い傾向を認めた ($P < 0.1$, Wilcoxon 検定)。

Fig. 5 は腎腫瘍の α 型 IFN に対する感受性試験の結果を示したものであるが, この中に少数例ながら 50 IU/ml 接触群でコロニー数が抑制されずむしろ増加 (対照群の標準誤差の2倍以上) したいわゆる augmentation case がみられた。

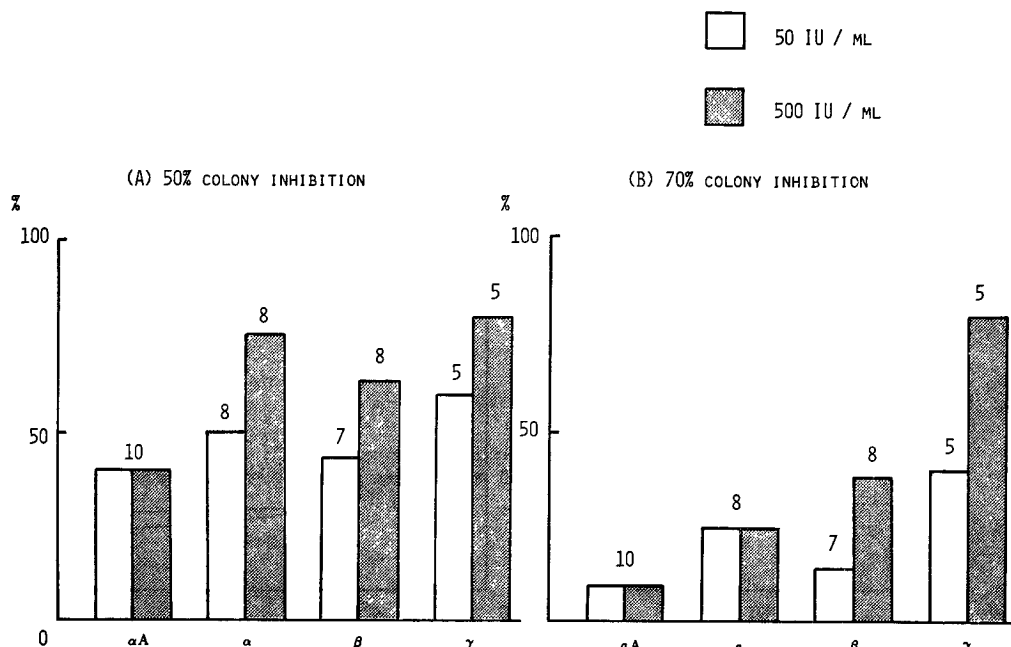


Fig. 3. Comparison of sensitivity for IFNs against renal tumors. The numbers of bars represent the cases of renal tumors. In order of the colony inhibition, the rank was $\gamma > \alpha > \alpha A, \beta$ with statistical significance ($P < 0.025$ Wilcoxon's test)

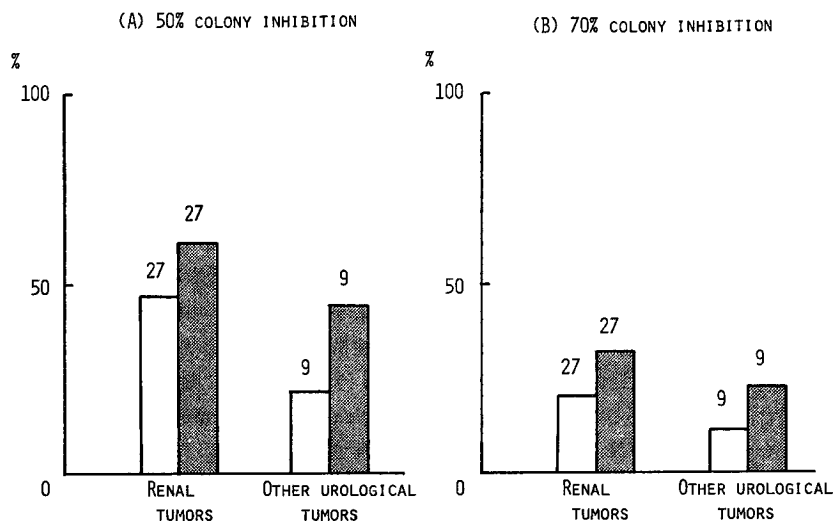


Fig. 4. Comparison of sensitivity for IFN between renal tumors and other urological tumors. Renal tumors had a tendency to be more sensitive to IFN than the other urological tumors ($P < 0.1$)

Ⅲ. 感受性の差による各症例の分類

これらの症例を簡略に整理するため Fig. 6 のような分類を試みた。

1. Sensitive group: 低濃度, 高濃度群とも70%以上のコロニー抑制を認める群。

2. Relative sensitive group: 低濃度群で約50%, 高濃度で70%以上の抑制を認める群 (A), または低濃度, 高濃度ともに50~70%の抑制を認める群 (B)。

3. Resistant group: 低濃度群で50%未満, 高濃

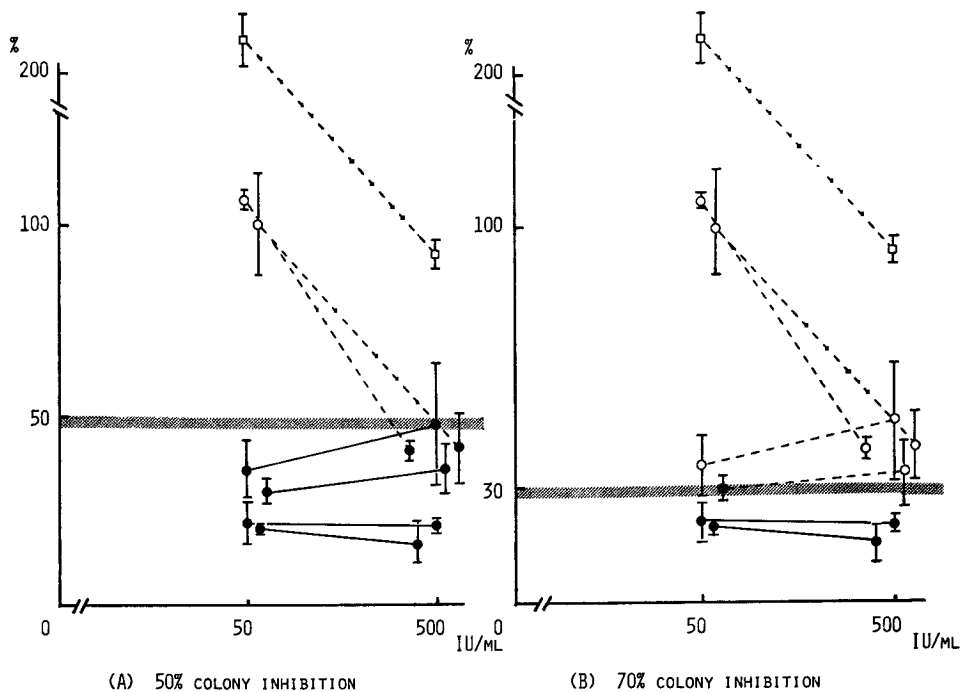


Fig. 5. The results of sensitivity test for IFN α

●—●: sensitive ○---○: resistant
□...□: augmentation

度群で70%未満の抑制を認める群。

4. Augmentation group: 低濃度または高濃度群で対照群より有意のコロニー数増加を認める群。

以上のように分類した場合、腎腫瘍でのべ27例中6例(22%)、その他の泌尿器腫瘍でのべ9例中2例(22%)、全体でのべ36例中8例(22%)が sensitive group に分類される。sensitive group は HTCA を用いた感受性試験では IFN に対して高い感受性を示す群である。relative sensitive group は IFN に対して比較的高い感受性を示す群で、全体では36例中8例(22%)がこの群に分類される。これらの群は臨床で IFN を投与した場合、有効性を得る可能性があると思われる。resistant group は IFN に対して感受性を示さない群で、腎腫瘍27例中11例(41%)、その他の泌尿器科腫瘍9例中6例(67%)、全体で36例中17例(47%)と約半数近くがこの群に含まれる。この群は臨床で IFN を投与した場合、有効性を得る可能性が低いと思われる。augmentation group は IFN 投与によりコロニー増殖を助長される群で、全体で36例中3例(8%)にみられた。この群は臨床で IFN を投与した場合、腫瘍の増大 (progressive disease) の可能性が高いと思われる。

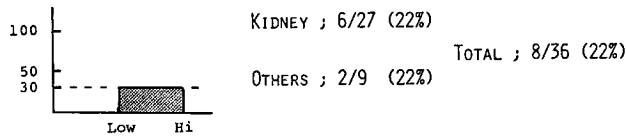
考 察

IFN は抗腫瘍効果を有することが発見されて以来、その作用機序が検討されてきたが未だ不明な点が多い。しかし IFN が、①腫瘍細胞に対する直接的抗腫瘍作用¹⁾ ②宿主細胞の免疫系を介する間接作用⁵⁾ ③細胞膜に対する作用⁶⁾ の3種の作用機序を有することは諸家の意見の一致をみているといつてよからう。このように作用機序が多面的であるため、従来の抗癌剤と性格が異なり、増殖抑制形式も cytostatic であるという報告が多く、最近では抗癌剤というより biological response modifiers (BRM) の範疇に入れている。

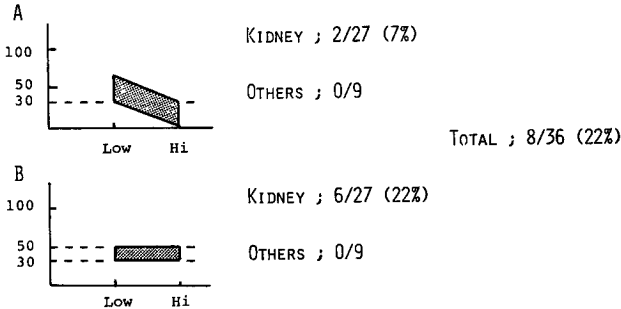
さてこの IFN の clinical phase study には膨大な費用と時間を要するものであるが *in vitro* で IFN の抗腫瘍効果を評価する方法がいくつか考案されている。そのひとつとして宿主網内系細胞 (たとえば natural killer cell) に対して IFN を作用させた後、継代腫瘍細胞株に対して宿主細胞の抗腫瘍効果をみる方法⁷⁾ がある。しかしこの方法では target となる腫瘍細胞は Primary tumor ではなく、しかも免疫系を介する間接作用のみを評価しているにすぎない。

そこでわれわれは Salmon らが考案した HTCA

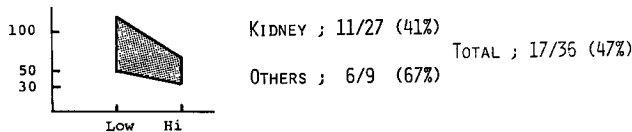
1. SENSITIVE GROUP



2. RELATIVE SENSITIVE GROUP



3. RESISTANT GROUP



4. AUGMENTATION GROUP

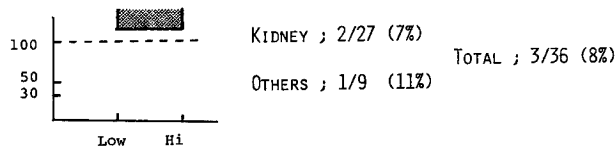


Fig. 6. Classification of the results of sensitivity test for IFN.

を用いて IFN に対する泌尿器腫瘍の感受性試験を行ない IFN の抗腫瘍効果を検討した。HTCA は新しい抗癌剤の *in vitro* phase II study として米国でもその評価は定着しつつあり、同法では IFN の直接作用および細胞膜に対する作用の評価が可能であると推定される。しかし寒天中に播種される腫瘍細胞浮遊液中の宿主免疫系細胞の存在が HTCA のコロニー形成能に影響を与えるという報告⁸⁾もあり、免疫系を介した間接作用の関与の可能性もないとはいえない。

HTCA を用いた IFN の抗腫瘍作用の評価は Epstein ら⁹⁾に端を発し、現在までに数多く報告されているが、泌尿器腫瘍に対する評価は比較的少ない。われわれが IFN に対して HTCA を用いた腎腫瘍の感受性試験の有効率 (sensitive group : 22%) は phase II study における有効率 (CR+PR+MR . 約20%)²⁾ とほぼ一致している。また腎腫瘍がその他の泌尿器腫瘍より IFN に対する感受性が高いというわれわれの結果も phase II study の結果とよく相関

しており、HTCA を用いた IFN の評価の妥当性を裏づけていると思われる。しかしこの際問題となるのは感受性の判定基準である。われわれは HTCA による従来の抗癌剤の評価の際用いられる50%コロニー抑制と70%コロニー抑制を併用して用い、低濃度 (50 IU/ml) および高濃度 (500 IU/ml) 接触群でのコロニー抑制率を総合的に判定したが、あくまでも試案であり臨床効果との相関より retrospective に決定すべきであろう。

次に各 IFN 間の比較であるが Wilcoxon 検定を用いて統計処理したところ、腎腫瘍の感受性は $\gamma > \alpha > \beta$ の順に高かった ($P < 0.05$)。この結果は γ の抗腫瘍効果の一般的な評価と一致¹⁰⁻¹²⁾しているが、異なる種類および作用機序の IFN の抗腫瘍効果を抗ウイルス価により決定された現行の単位で比較することは問題があり、再考の余地があると思われる。Salmon らは αA と αD の抗腫瘍効果の比較を重量単位 (ng) で行ない、きわめて良好な結果が得られたと

報告している¹³⁾。また同じ α 型 IFN でも α は αA より腎腫瘍の感受性が高いという結果については α が αA より抗腫瘍効果の高い subtype を有することや recombinant type である αA が遺伝子組換技術では糖鎖を持つことができず、この糖鎖の存在が抗腫瘍効果に影響を与える可能性が推定される。 α 型 IFN は濃度差による感受性の差はなくほぼ一定であるが、 β , γ は高濃度接触群ほど感受性が高く濃度依存性を示していた。この結果より、今後の IFN の投与方法としても α 型 IFN は低濃度持続投与、 β および γ は大量間歇投与の有用性が示唆される。

最後に augmentation group の存在について言及する。IFN 投与によりコロニー増殖がみられたり¹⁴⁾、実験動物で腫瘍が増大したという報告¹⁵⁾は少なくない。Ludwig らは IFN 投与により、対照群コロニー数の標準誤差の2倍以上、コロニー増殖がみられた症例をコロニー増殖症例と定義し、225の HTCA 施行症例中30例(13.3%)、腎癌10例中2例(20%)に augmentation case がみられ、同時に行なった H³ の取り込みも著明に増加しており、この傾向は低濃度ほど顕著であったと述べている¹⁶⁾。また低濃度 IFN (50~100 IU/ml) と高濃度 IFN (1,000 IU/ml 以上) とではその作用が全く逆になることがあり、フレンド赤芽球性白血病のある種のクローンでは低濃度 IFN によりヘモグロビン産生細胞への分化誘導が促進されるが、高濃度では逆に阻害されるという¹⁷⁾。生体内の IFN 血中濃度より推定すると、腫瘍内濃度は比較的 low 濃度が長く持続するという状態が考えられ、この状態は HTCA における IFN の低濃度接触群にある程度類似していると思われる。したがってこの感受性試験で augmentation group がみられたということは臨床投与の際にも augmentation すなわち PD (progressive disease) が IFN 投与によりおこっている可能性を示唆している。

従来 HTCA による抗癌剤の評価は true negative rate が 90~95% ときわめて高く、腫瘍に無効な抗癌剤の除去に適しているといわれている¹⁸⁾。そこで IFN においても本法により感受性を有しない症例(われわれの分類では 3. resistant group および 4. augmentation group) に対しては progressive disease の可能性もあり、投与をひかえた方がよいと思われる。これらの症例の選択に対して本法は大いに有用な感受性試験といえよう。

結 語

われわれは各種 IFN (α , αA , β , γ) に対する泌尿

器腫瘍(腎腫瘍22例を含む)の感受性試験を HTCA を用いて行なった。その結果、腎腫瘍はその他の泌尿器腫瘍に比べ IFN に対する感受性が高く、各 IFN 間の比較では $\gamma > \alpha > \alpha A$, β の順に腎腫瘍の感受性が高かった。また施行症例を感受性の程度に応じて4群に分類したとき、36例中8例(22%)が sensitive group に分類されたが3例(8%)が augmentation group に属した。HTCA を用いた IFN に対する感受性試験は *in vitro* phase II study として意義があるとともに IFN に対する無効例および augmentation の危険のある症例の除外に有用であると思われる。

稿を終えるにあたり、終始御指導ならびに御校閲を賜りました恩師酒徳治三郎教授に深甚なる感謝の意を表します。

また本研究に際し直接御指導いただきました山本憲男助教授に深謝するとともに薬剤の供与および力価の測定を快諾された日本ロシユ、大塚製薬、協和発酵各社に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は第72回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Pauker K, Cantell K and Henle W: Quantitative studies on viral interference in suspended L cell III. Effect of interfering viruses and interferon on the growth rate of cells. *Virology* 17: 324~334, 1962
- 2) Taguchi T, Takakura K, Kimura K, Ohta K, Izuo M, Koyama Y, Niijima T, Ikeda S and Akahoshi Y: Clinical studies of recombinant leukocyte A interferon (r-IFN- αA), International interferon symposium, Kyoto, 1983, in press
- 3) Hamburger AW and Salmon SE: Primary bioassay of human stem cells. *Science* 197:461~463, 1977
- 4) Koyama Y: Pharmacokinetics and clinical trials of HuIFN- β in malignant tumors, International interferon symposium, Kyoto, 1983, in press
- 5) Lindahl-Magnusson P, Leary P and Gresser I: Interferon inhibits DNA synthesis induced in mouse lymphocyte suspensions by phytohaemagglutinin or by allogeneic cells. *Nature (New Biol)* 237: 120~121, 1972
- 6) Fridman WH, Gresser I, Bandu MT, Aguet

- M and Neauport-Sautes C : Interferon enhances the expression of Fc γ receptors. *J Immunol* **124**: 2436~2441, 1980
- 7) Herberman RR, Ortald JR and Bonnard GD: Augmentation by interferon of human natural and antibody dependent cell-mediated cytotoxicity. *Nature* **277**: 221~223, 1979
- 8) Buick RN, Fry SE and Salmon SE : Effect of host-cell interactions on clonogenic carcinoma cells in human malignant effusions. *Br J Cancer* **41**: 695~704, 1980
- 9) Epstein LB, Shen J, Alele JS and Reese JS: Sensitivity of human ovarian carcinoma cells to interferon and other antitumor agents as assessed by an in vitro semi-solid agar technique. *Ann NY Acad Sci* **350**: 228~244, 1980
- 10) Crane Jr JL, Glasgow LA, Kern ER and Youngner JS : Inhibition of murine osteogenic sarcomas by treatment with type I or type II interferon. *J Natl Cancer Inst* **61**: 871~874, 1978
- 11) Fleischman Jr WR, Kleyn KM and Baron S: Potentiation of antitumor effect of virus-induced interferon by mouse immune interferon preparation. *J Natl Cancer Inst* **65**: 963~966, 1980
- 12) Salivan SB, Younger JS, Nishio J and Neta R : Tumor suppression by a lymphokine released into the circulation of mice with delayed hypersensitivity. *J Natl Cancer Inst* **55**: 1233~1236, 1975
- 13) Salmon SE, Durie BGM, Young L, Liu RM, Trown PW and Stebbing N: Effect of cloned human leukocyte interferons in the human tumor stem cell assay. *J Clin Oncol* **1**: 217~225, 1983
- 14) Bradley EC and Ruscetti FW Effect of fibroblast, lymphoid, and myeloid interferons on human tumor colony formation in vitro. *Cancer Res* **41**: 244~249, 1981
- 15) Gazdar AF: Enhancement of tumor growth rate by interferon inducers. *J Natl Cancer Inst* **49**: 1435~1438, 1972
- 16) Ludwig CU, Durie BGM, Salmon SE and Moon TE Tumor growth stimulation in vitro by interferons. *Eur J Cancer Clin Oncol* **19**: 1625~1632, 1983
- 17) Luftig RB, Conscience JF, Skoultchi A, Mcmillan P, Revel M and Ruddle FH: Effect of interferon on dimethyl sulfoxide-stimulated Friend erythroleukemic cells: Ultrastructural and biochemical study. *J Virol* **23**: 799~810, 1977
- 18) Von Hoff DD, Casper J, Bradley E, Sandbach J, Jones D and Makuchi R: Association between human tumor colony-forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am J Med* **70**: 1027~1032, 1981

(1985年7月11日受付)