

腎細胞癌化学療法の *in vitro* での実験的研究

2. 細胞回転からみたインターフェロンと制癌剤との併用効果

滋賀医科大学泌尿器科学教室（主任：友吉唯夫教授）

神 波 照 夫

EXPERIMENTAL STUDY OF CHEMOTHERAPY
OF RENAL CELL CARCINOMA2. COMBINATION EFFECT OF INTERFERON AND ANTITUMOR
AGENTS BASED ON CELL KINETIC ANALYSIS

Teruo KONAMI

From the Department of Urology, Shiga University of Medical Science

(Director: Prof. T. Tomoyoshi)

To establish a useful combination therapy of interferon (IFN) with antitumor agents, I investigated the antiproliferative effect and change of DNA histograms *in vitro* after the IFN exposure either alone or in combination with antitumor agents, simultaneously or sequentially, on NC-65 cells derived human renal cell carcinoma. The IFN used was recombinant interferon α -2a (IFN- α) and the antitumor agents selected were vincristine (VCR) and adriamycin (ADM).

IFN- α suppressed the proliferation clearly in a dose dependent manner but not so apparently even after the 96-hour exposure. Six to 12 hours after the exposure of IFN- α , accumulation of the cells in the G₁ phase was observed at the higher concentration, and then increase of S phase cells up to 72 hours, suggesting a G₁-S block at a short period and then prolongation of S-phase.

VCR combined with IFN- α suppressed NC-65 cell proliferation additively, whereas ADM combined with IFN- α suppressed it rather less than additively. The sequential exposure of IFN followed by VCR induced the enhancement at a higher concentration but that followed by ADM did not, suggesting that IFN-induced cell modification made the cells more sensitive to VCR.

Dose dependent accumulation in the G₁-S boundary phase was observed after the combined exposure of IFN- α and antitumor agents, especially by sequential exposure, and then accumulation in S and G₂-M were observed. The delay of cell progression in the S phase was likely significant when IFN- α was used with antitumor agents, such as VCR and ADM.

Key words: Renal cell carcinoma, Combination chemotherapy, Interferon, Antitumor agents, Cell kinetics

緒 言

インターフェロン（以下 IFN と略す）は、発見当時注目された抗ウイルス作用だけでなく、さまざまな形式で抗腫瘍作用を発現することがあきらかとなり、

基礎的な研究とともに近年では種々の領域で臨床応用も試みられている。

IFN の抗腫瘍作用については、直接的な増殖抑制作用と、自己防御機構に関係した免疫学的な作用の2つの面から検討されてきた¹⁻³⁾。IFN の種特異性から、

in vivo での実験系に比べ、*in vitro* では直接抗腫瘍効果の検討が容易なことから、line 化されたヒト癌細胞をもちい、増殖抑制効果や作用機構についてすでに多数の報告がみられる^{4~11)}。これらのうち、cell cycle におよぼす影響については、IFN 存在下では、細胞回転を遅延させることが知られているが^{7~11)}、具体的にどの phase で阻害されるかについては、いまだ一定した見解は得られていない。一方、IFN の臨床応用は、白血病、骨肉腫、悪性リンパ腫、悪性黒色腫などに投与され、有効な症例も報告されている^{12~13)}。泌尿器科領域においても、腎細胞癌での有効性は上記の悪性腫瘍に対する効果に匹敵するものであるとされ^{14~16)}、大きな期待がかけられてきた。しかし、近年の報告をみると、単独投与による治療効果には限界があることが次第に明らかとなり、制癌剤との併用効果が基礎的、あるいは臨床的に検討されつつある^{17~19)}。しかし IFN の単独投与あるいは制癌剤との併用においても、その理論的背景はいまだ確立されるには至っていない。著者は、第1報においてヒト腎癌由来の細胞株である NC-65 細胞をもちい、制癌剤が及ぼす cell kinetics への影響も考慮した併用効果の実験を行ない至適投与法について考察した²⁰⁾。今回は IFN の持つ直接増殖抑制効果のうち、とくに細胞回転に対する影響について注目し、flow cytometry (以下 FCM) をもちい検討した。さらに、このような細胞回転の変化からみて、制癌剤と IFN との有効な併用についても検討したので報告する。

実験材料および方法

1. 細胞

実験にもちいた細胞は第1報と同じ、ヒト腎細胞癌由来の NC-65 細胞で^{20,21)}、培養液は Eagle's MEM (10% FCS) をもちいた。この細胞の生物的特性については、第1報に報告したとおりである。

2. インターフェロン

今回実験にもちいた IFN- α は、組換え型ヒト白血球インターフェロン A (rIFN- α A, 日本ロシユ) で、その比活性は 4×10^8 mcg/mg 蛋白質である。IFN 濃度は臨床における血中濃度を参考にし、4,000 IU/ml から倍数希釈して、計4濃度をもちい持続接触させた。

3. 制癌剤

併用する制癌剤としては、第1報で本細胞に有効と考えられた vincristine (以下 VCR)、adriamycin (以下 ADM) について、単独でそれぞれ約50%増殖を抑制する VCR 1.6×10^{-2} /ml、ADM 3×10^{-2} /ml の濃度をもちい検討した。

4. 実験方法

実験は、原則として各条件下で triplicate とし、3回以上繰り返し行なった。薬剤による増殖抑制効果の算定は、第1報と同様に同一区域内写真撮影法により対照群に対する増殖比率 (percent growth P.G) であらわし、この値を Fleisher の逆正弦変換法をもちい角変換 ($\text{Arcsin} \sqrt{\text{PG}}$) し、効果の比較にもちいた。FCM 検体の作製法は、第1報で記載した方法をもちい、細胞周期の比率は、Baisch ら²²⁾の方法に準じ算出し、各条件で3回繰り返し、それぞれの平均値であらわした。

5. 併用効果の比較

併用による効果の比較は次の手順で行なった。まず IFN- α および各制癌剤単独での増殖比率を算出し、角変換した値を求めた。次に IFN の各濃度と上記制癌剤との併用によって得られた増殖比率から角変換した値を求めた。この値と、あらかじめ測定した各制癌剤および IFN- α それぞれ単独での効果の積一期待値 (expected effect) 一との差一併用効果値 (combination value) 一を有効性をあらわす指標とした。なお各実験群間の比較は対応のない t 検定をもちいて行なった。

実験 1

a. IFN- α 単独での増殖抑制効果

1×10^4 /ml の細胞を 6×6 cm プラスチックシャーレに接種した後、48時間後に 4,000 IU/ml, 2,000 IU/ml, 1,000 IU/ml, 500 IU/ml, 250 IU/ml の IFN- α を添加した。薬剤接触前より連日計16区画の同一区域内を写真撮影し、薬剤接触前の細胞数との比をとり増殖率とし、これを片対数表上にプロットし、増殖曲線を作成した。

b. IFN- α による細胞回転の経時的変化

5×10^4 /ml の細胞をプラスチックボトルに接種した後、48時間後に各濃度の IFN- α を浮加し、6時間、12時間、24時間、36時間、48時間、72時間に、FCM での細胞周期の変化を検討した。

実験 2

a. IFN- α と制癌剤の併用による増殖抑制効果 (Fig. 1)

Fig. 1 に示すように、IFN- α と、VCR あるいは ADM との併用効果について、1) IFN- α と制癌剤同時併用群、2) IFN- α 先行投与後制癌剤投与の2群に分け、両者の増殖比率に対する効果を比較した。すなわち培養48時間後に各濃度の IFN- α と VCR (1.6×10^{-2} /ml)、あるいは ADM (3×10^{-2} /ml) を2時間同時接触させ、その後同濃度の IFN- α を持続接触

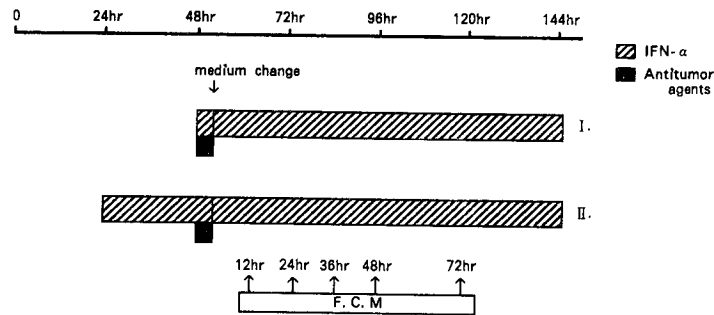


Fig. 1. Schedules of drug treatment to compare two experimental groups

Table 1. Relative growth rate (percent growth P.G.) estimated 144 hours after cell seeding.

After 24 hrs; 1IFN exposure 24 hrs after cell seeding

After 48 hrs; 1IFN exposure 48 hrs after cell seeding

 $\text{Arcsin } \sqrt{\text{P.G.}} = \sin^{-1} \sqrt{\text{P.G.}}$

	IFN- α concentration	4000 IU/ml	2000 IU/ml	1000 IU/ml	500 IU/ml	250 IU/ml
After	Percent Growth (P.G.)	46.60 $\pm$ 4.63	55.35 $\pm$ 3.91	62.58 $\pm$ 6.75	75.86 $\pm$ 5.36	91.23 $\pm$ 9.30
24 hr.	$\text{Arcsin } \sqrt{\text{P.G.}}$	43.05 $\pm$ 2.78	48.07 $\pm$ 2.31	52.28 $\pm$ 4.05	60.57 $\pm$ 3.16	72.76 $\pm$ 5.67
After	Percent Growth (P.G.)	49.49 $\pm$ 3.72	56.53 $\pm$ 6.91	62.83 $\pm$ 7.13	75.29 $\pm$ 8.40	92.95 $\pm$ 8.74
48 hr.	$\text{Arcsin } \sqrt{\text{P.G.}}$	44.71 $\pm$ 2.15	48.80 $\pm$ 4.05	52.51 $\pm$ 4.25	60.52 $\pm$ 5.85	74.97 $\pm$ 5.42

した1群, 培養後24時間より, あらかじめ各濃度の IFN- α を接触させておき, さらに24時間後に制癌剤を2時間接触させ, 以後同濃度の IFN- α を持続接触させた2群に分け, 前述の方法でその有効性を比較した。

b. IFN- α と制癌剤の併用による, 細胞回転の経時的变化

$5 \times 10^4/\text{ml}$ の細胞を接種した後, 実験2のaと同様に, 1群, 2群の各条件下における, FCMの経時的变化を, 制癌剤接触後12時間, 24時間, 36時間, 48時間, 72時間で検討した。

結 果

実験1

a. IFN- α 単独での増殖抑制効果 (Fig. 2, Table 1)

IFN- α 作用後48時間までは, 500 IU/ml 以下の低濃度群では対照群以上の増殖率を示したが, その後, 時間を経過するとともに徐々に濃度依存性に増殖は抑制された (Fig. 2)。

培養後24時間あるいは48時間後から IFN- α を持続

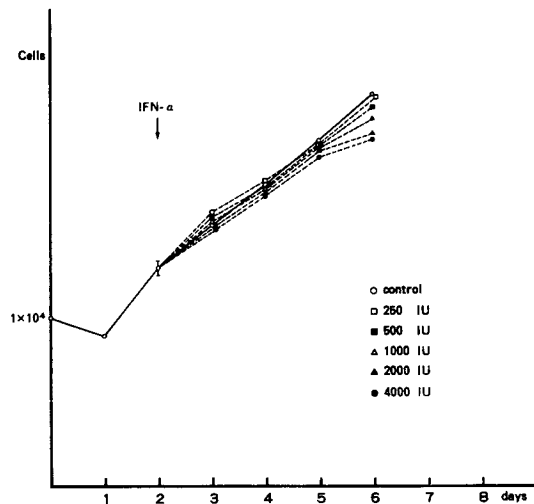


Fig. 2. The effect of interferon- α on the multiplication of NC-65 cells. Cells were treated with interferon at several concentrations 48 hours after seeding into Petri dishes. Dose dependent inhibition was observed.

させ、培養後144時間後に算定した増殖比率はTable 1に示すように、IFN- α 4,000 IU/ml で46.6%, 49.5%と、IFN- α 作用後の時間による若干の違いを認めたが、濃度が低下するにつれ、ほぼ同様の増殖比率を示した。

b. IFN- α による細胞回転の経時的变化 (Fig. 3)

IFN- α の高濃度領域においては6時間から12時間にかけて軽度の G1 期の増加, G2-M 期の減少を示し、IFN- α 接触後12時間で、4,000 IU/mlでは G1後期から S 期前半の低下を示した。24時間からは、S 期の増加が濃度依存性にみられ、36時間後には最も顕著となり、72時間後でも若干の S 期の増加を示した。

実験 2

a. IFN- α と制癌剤の併用による増殖抑制効果 (Table 2, 3)

VCR と IFN- α との併用では、同時併用、IFN- α 先行投与による併用においても、IFN- α 濃度の増加に

伴い増殖は抑制されるが、期待値との差であらわされたcombination valueをみると、IFN- α 4,000 IU/ml 先行投与後 VCRを接触させた場合を除き、濃度増加による効果の増強はみられなかった。IFN- α 1,000 IU/ml 以上では同時接触に比べ IFN- α を先行投与した群では強い増殖抑制を示すが、有意の差を示したのは IFN- α 4,000 IU/ml ($p<0.01$), 1,000 IU/ml ($p<0.05$)のみであった (Table 2)。

ADMと IFN- α との併用では、同時併用でも IFN- α 先行投与による併用においても、ADM単独での増殖抑制効果と大差は無く、IFN- α の濃度を増加しても増殖抑制の増強はみられなかった。また、IFN- α のいずれの濃度においても、同時接触と IFN- α の先行投与群で増殖抑制に有意差は無く、2,000 IU/ml 以下の濃度ではむしろ同時併用の方が増殖比率は低値であった (Table 3)。

b. IFN- α と制癌剤との併用による細胞回転の経

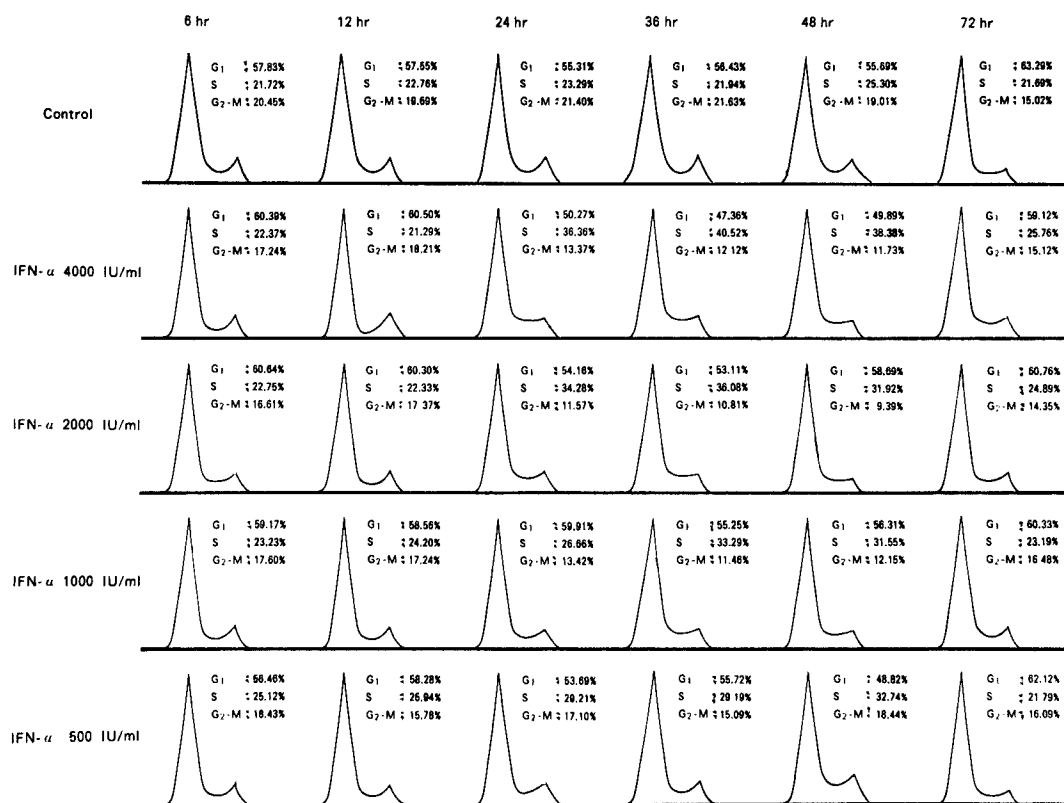


Fig. 3. Changes of DNA histograms after the continuous exposure of IFN- α at several concentration. 6 to 12 hours after the treatment, G1 cells were higher than the control and G1-S boundary phase was decreased at the concentration of IFN 4,000 IU/ml. After 24 hours, accumulation of S phase was observed and continued to 72 hours.

Table 2. Comparison of combination effect of IFN- α and vincristine between simultaneous and sequential exposure.

Drug combination	Percent Growth (P.G)	Arcsin $\sqrt{P.G}$	Expected effect	Combination value	F ratio	Calculated t
IFN- α 4000 IU/ml + VCR 1.6×10^{-2} mcg/ml	34.68 ± 5.29	36.04 ± 3.18	20.98	-15.06	1.06	2.86
IFN- α 4000 IU/ml $\xrightarrow{24 \text{ hr}}$ VCR 1.6×10^{-2} mcg/ml	27.90 ± 4.80	31.81 ± 3.09	20.20	-11.61		
IFN- α 2000 IU/ml + VCR 1.6×10^{-2} mcg/ml	38.46 ± 5.32	38.30 ± 3.14	22.90	-15.40	1.08	0.58
IFN- α 2000 IU/ml $\xrightarrow{24 \text{ hr}}$ VCR 1.6×10^{-2} mcg/ml	36.99 ± 5.50	37.42 ± 3.26	22.55	-14.87		
IFN- α 1000 IU/ml + VCR 1.6×10^{-2} mcg/ml	47.05 ± 4.89	43.30 ± 2.70	24.64	-18.66	1.94	2.44
IFN- α 1000 IU/ml $\xrightarrow{24 \text{ hr}}$ VCR 1.6×10^{-2} mcg/ml	40.57 ± 6.41	39.77 ± 3.77	24.53	-15.24		
IFN- α 500 IU/ml + VCR 1.6×10^{-2} mcg/ml	49.75 ± 7.01	44.88 ± 4.04	28.40	-16.48	1.22	0.05
IFN- α 500 IU/ml $\xrightarrow{24 \text{ hr}}$ VCR 1.6×10^{-2} mcg/ml	49.79 ± 6.34	44.89 ± 3.66	28.37	-16.52		

*P<0.01 **0.01<P<0.05

Table 3. Comparison of combination effect of IFN- α and adriamycin between simultaneous and sequential exposure.

Drug combination	Percent Growth (P.G)	Arcsin $\sqrt{P.G}$	Expected effect	Combination value	F ratio	Calculated t
IFN- α 4000 IU/ml + ADM 3×10^{-2} mcg/ml	46.59 ± 9.08	42.99 ± 5.32	21.05	-21.94	2.97	0.95
IFN- α 4000 IU/ml $\xrightarrow{24 \text{ hr}}$ ADM 3×10^{-2} mcg/ml	43.15 ± 53.32	41.05 ± 3.09	20.27	-20.78		
IFN- α 2000 IU/ml + ADM 3×10^{-2} mcg/ml	47.95 ± 4.50	43.82 ± 2.58	22.98	-20.84	1.07	0.80
IFN- α 2000 IU/ml $\xrightarrow{24 \text{ hr}}$ ADM 3×10^{-2} mcg/ml	49.60 ± 4.40	44.79 ± 2.50	22.64	-22.15		
IFN- α 1000 IU/ml + ADM 3×10^{-2} mcg/ml	45.87 ± 4.48	42.63 ± 2.59	24.73	-17.90	2.32	1.30
IFN- α 1000 IU/ml $\xrightarrow{24 \text{ hr}}$ ADM 3×10^{-2} mcg/ml	49.47 ± 6.82	44.69 ± 3.95	24.62	-20.07		
IFN- α 500 IU/ml + ADM 3×10^{-2} mcg/ml	52.90 ± 4.76	46.67 ± 2.74	28.50	-18.17	2.40	0.63
IFN- α 500 IU/ml $\xrightarrow{24 \text{ hr}}$ ADM 3×10^{-2} mcg/ml	54.72 ± 7.37	47.73 ± 4.26	28.52	-19.21		

時的变化 (Fig. 4a, b, 5a, b)

VCR と IFN- α を同時接触し、その後の FCM の変化をみると、12時間後に、IFN の高濃度では VCR 単独と比べ、G1-S 期移行部の増加を認め、G1 期の増加を示すが、IFN- α の濃度が低下するにつれ G1 期は減少し、逆に G2-M 期の割合が増加した。とくに IFN- α の高濃度領域では G1 期後期から S 期前

半への細胞の集積が特徴的で、S 期の比率はすべての濃度で VCR 単独群に対し高値であった。24時間後から G2-M 期の比率は低下し、さらに36時間では S 期の増加が顕著となった。その後48時間から72時間にかけても濃度依存性に S 期への集積がみられた (Fig. 4a)。

IFN- α を培養後24時間から接触させておき、さら

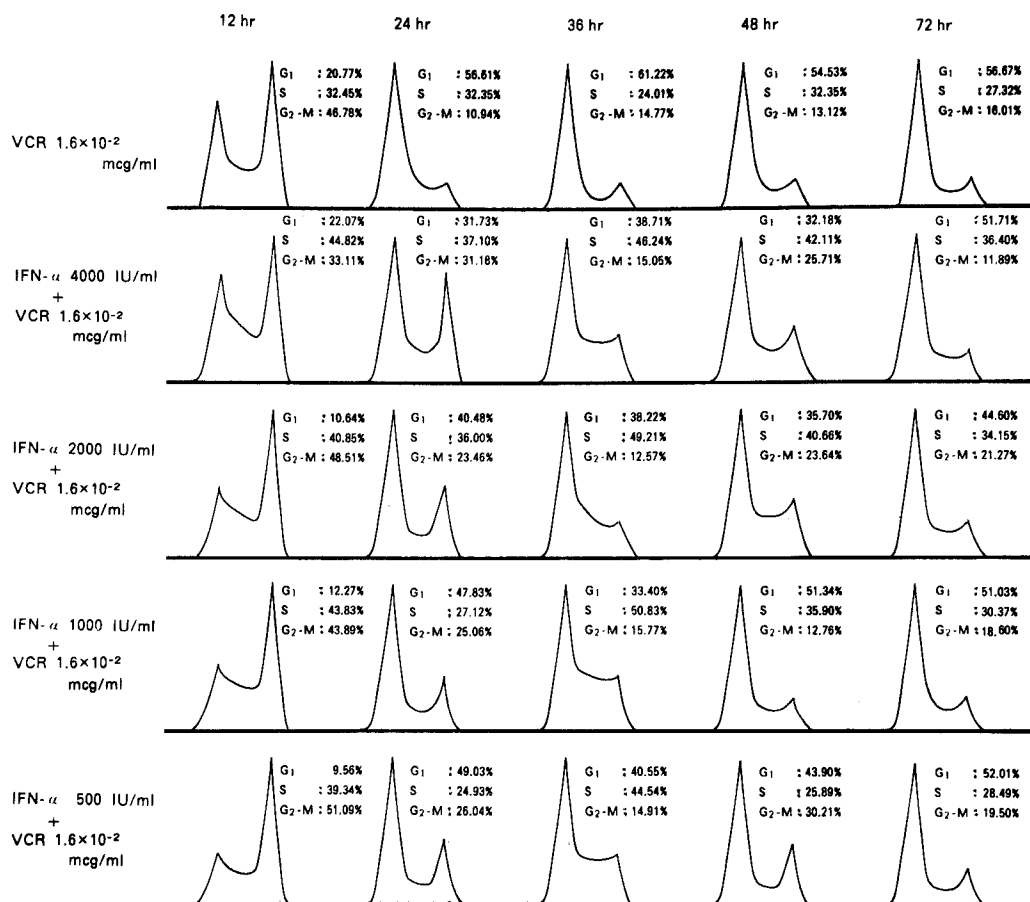


Fig. 4, a Changes of DNA histograms after the simultaneous exposure of IFN- α and vincristine. After 12 hours, G₁ phase increased at higher concentration, and in contrast decreased at lower concentration. Accumulation of G₁-S boundary was markedly observed. After 24 hours, G₂-M phase was decreased gradually showing the S phase accumulation until 72 hours.

に24時間後にVCRを接触させると、12時間後では同時接触に比べG₁後期からS期の比率がさらに増加し、G₂-M期への集積は減少する。24時間後では、G₁後期からS期前半の増加は認めるものの、G₂-M期への集積が同時接触に比し、より顕著であった。36時間から48時間にかけては、同時接触と同様、S期の増加がみられ、72時間ではさらにS期が増加する傾向を示した (Fig. 4b)。

ADMとIFN- α の同時接触では、12時間後にIFN- α の各濃度でG₁期後期からS期前半への集積がみられ、IFNの高濃度領域ではG₁期はADM単独に比しわずかながら高値であった。24時間後では、12時間後に比し、G₂-M期は低下し、36時間以後では、IFN- α の各濃度でS期の増加を示すが、低濃度

で時間の経過とともにS期からG₂-M期への比率が増加していく傾向を示した (Fig. 5a)。

IFN- α を先行投与し、ADMを24時間後に接触させると、12時間後に同時接触に比べ、著明なG₁後期からS期への集積がみられた。24時間後ではS、G₂-M期が増加し、72時間後までS期の増加は、顕著であった (Fig. 5b)。

考 察

1960年 Atanasiu & Chany²³⁾によりIFNの抗腫瘍作用が見いだされて以来、多くの研究者によりその特性について報告されてきた⁴⁻¹¹⁾。この結果、一般にIFNは殺細胞効果は示さず、その効果はcytostaticな作用であることが明らかとなってきた。この抗細胞

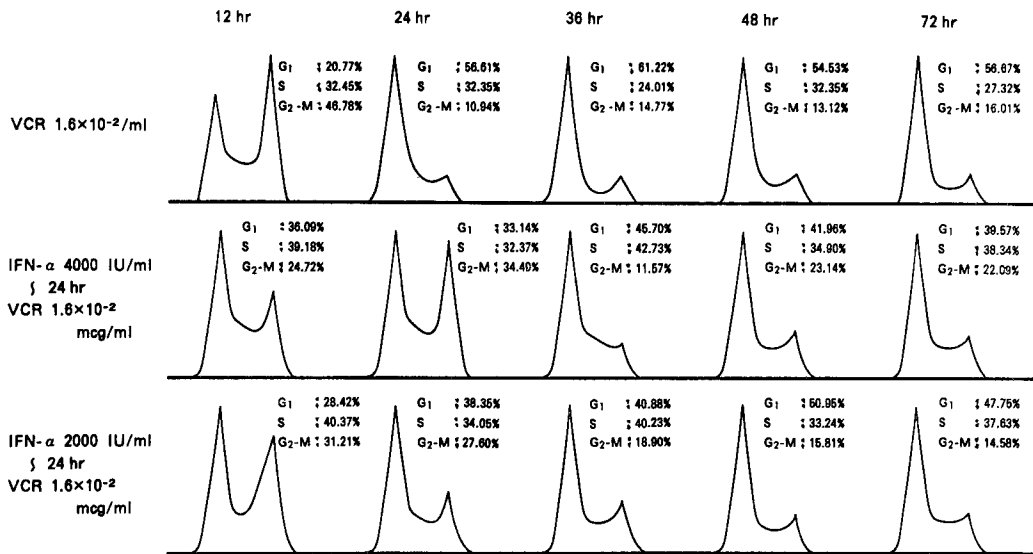


Fig. 4, b Changes of DNA histograms after the sequential exposure of IFN- α following the exposure of vincristine 24 hours later. Increase of G₁-S boundary phase was observed more remarkable than the simultaneous treatment and S and G₂-M phase accumulation was seen longer.

増殖作用は、必ずしも腫瘍細胞に選択的に作用するわけではなく、また腫瘍細胞の種類によりその反応は異なり、このような感受性の差は、細胞表面の receptor の量に関係するとされている。このように細胞表面の receptor に結合した IFN によりさまざまな細胞内の生化学的変化が生じるのであるが、細胞内の最終的な変化として DNA⁸⁻¹⁰⁾、RNA^{9,11)} あるいはタンパク質合成の低下⁹⁾ などが報告され、これらの結果細胞回転にもなんらかの変化をきたし、細胞増殖が抑制されるものと考えられている。d'Hooghe ら⁷⁾は連続写真撮影法をもちい、IFN による有糸分裂時間間隔の延長、generation time の延長を認め、第 3, 4 世代にとくに顕著であることを明らかにしているが、Killaender ら²⁴⁾は IFN がとくにどの相をブロックするということはみられなかったとしている。これに対し多くの研究者により G₁ 期から S 期の移行率の減少²⁵⁾と、これに続く S 期、分裂期の延長が報告されている²⁶⁻³⁴⁾。これらの実験の多くは、比較的 IFN に感受性の高い培養細胞をもちい、特殊な chemostat をもちいた同調培養や、thymidine, colchicine などにより同調された細胞に対するアイソトープの取り込みをみたものであるが、細胞の IFN に対する感受性や、また実験条件により微妙にその効果は異なり、細胞回転に関する詳細な点についてはまだ結論は得られていない。今回実験にもちいた NC-65 細胞は濃度依存性に増殖は

抑制されるが、長時間接触にもかかわらず増殖抑制に高濃度の IFN を要し、比較的感受性の低い部類に属しているといえる。しかし、このような感受性の低い細胞で、しかも非同調細胞においても、FCM による DNA ヒストグラムの変化をみると、特徴的な所見が認められた。第 1 に、IFN 単独接触後 6 時間から 12 時間にかけては高濃度で軽度の G₁ 期の増加を示し、接触後 12 時間での FCM 波形上 4,000 IU/ml では S 期前半の細胞が減少した。また制癌剤との併用においては、12 時間から 24 時間にかけて G₁ 後期から S 期前半への集積がみられたことである。Sokawa らは、confluent な状態となり G₁ 期に同調された細胞に対し、血清を加えると対群照でも IFN 処理群でも 12 時間の lag period をおいて DNA 合成が開始されるが、IFN 処理群では DNA 合成の比率が減少することから、IFN は G₁ 期から S 期への導入率 (transition probability) を低下させる作用を有することを示し、また IFN の作用点は G₁ 期に特異的であるとしている²⁵⁾。その後、Creasey ら²⁶⁾、Fuse, Kuwata²⁷⁾により G₁ 期から S 期への導入率ばかりでなく、その後の S 期の延長、分裂期の延長も認められることが示されたが、最近の報告では、DNA 合成に必要な thymidine の transport および uptake の低下を示すことが次第に明らかとなり^{8,31)}、IFN により DNA 合成の開始が遅延することは事実のようである。

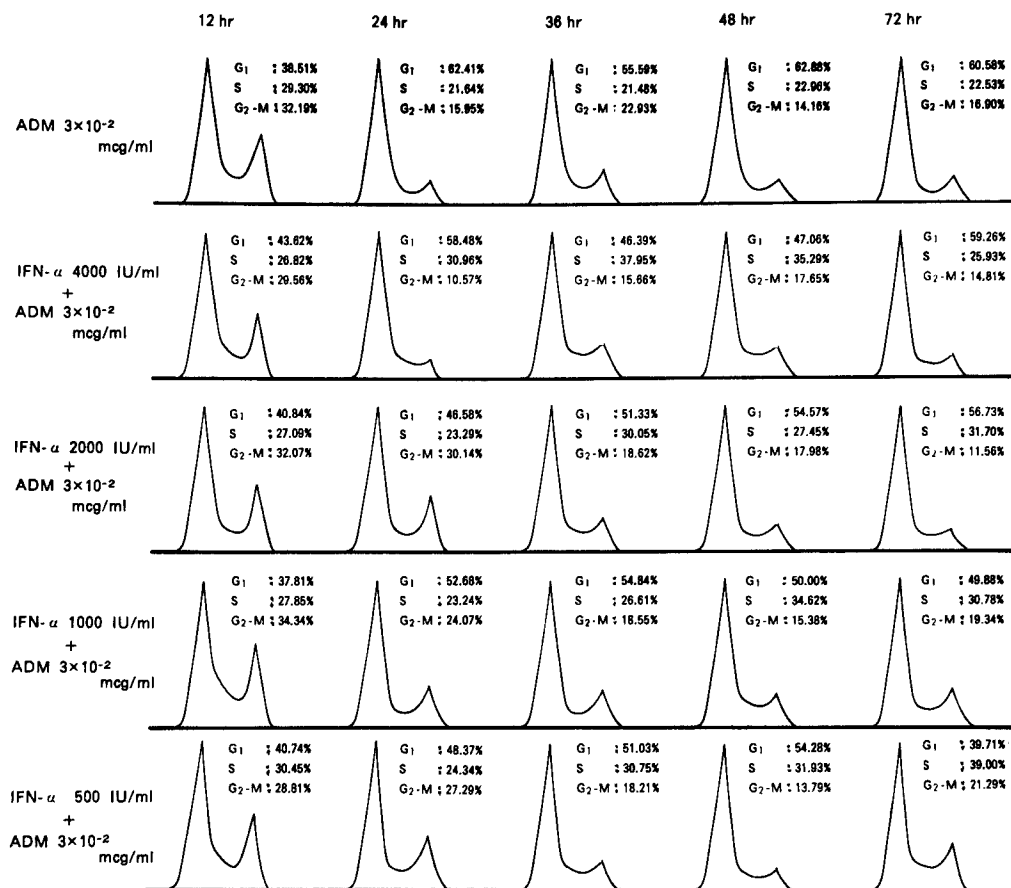


Fig. 5, a Changes of DNA histograms after the simultaneous exposure of IFN- α and adriamycin. G₁ phase was slightly increased 12 hours after the exposure and accumulation of G₁-S boundary phase was observed. After 24 hours G₂-M phase was decreased gradually and then accumulation of S phase continued until 72 hours.

非同調細胞をもちいた本実験における上記の結果は、IFN 単独で G₁ 期に高率な細胞集団において、4,000 IU/ml という高濃度で G₁ 期から S 期への移行が強く阻害されたものと考えられる。また VCR, ADM の同時併用により、G₂-M 期に細胞が高率に集積した状態では、その細胞回転阻害部位は S 期前半から中期に移行し S 期前半への細胞の集積がみられたものと推察される。したがって、IFN 接触後短時間では G₁-S 期移行部あるいは S 期前半での細胞回転の遅延がみられ、この作用は高濃度で顕著であることが示された。第 2 の FCM 上の変化の特徴として、24 時間後から S 期細胞の増加が長時間見られる点である。IFN 処理細胞における DNA 合成の低下または延長はすでに多くの研究者により報告されてきたが^{18-19, 26-31)}、本実験における FCM の変化をみると、S 期の

増加は高濃度では 36 時間がピークで、低濃度ではそのピークが遅れるが同程度にみられた。増殖曲線から、増殖抑制が顕著となる時期と S 期の増加の時期が一致することからも、S 期増加は DNA 合成が増強した結果ではなく、DNA 合成の延長と考えるのが妥当であろう。しかも、このような S 期の延長は制癌剤との併用、とくに IFN- α を先に投与しておいたほうが長時間にわたり認められた。第 3 番として G₂-M 期の変化である。制癌剤とくに VCR との併用において同時接触後 12 時間で、低濃度で G₂-M 期の比率は VCR 単独に比べても明らかに高値を示す。すなわち、IFN の高濃度では、前述の G₁ 期から S 期への阻害がおもな作用であるが、IFN の低濃度では、G₂-M 期がかえって増加し、その後の細胞回転の動きをみると、徐々に細胞回転は進行する。IFN 添加後の増殖曲線からは、

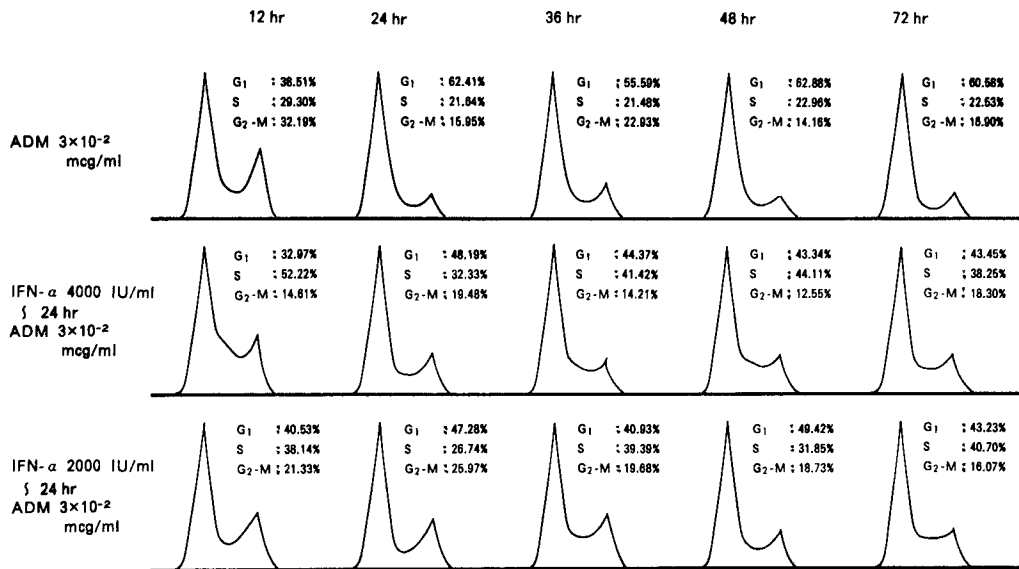


Fig. 5, b Changes of DNA histograms after the sequential exposure of IFN- α following the exposure of adriamycin 24 hours later. Accumulation of G₁-S boundary phase was observed more remarkable than simultaneous exposure.

IFN の低濃度では増殖は対照群に比較して、かえって促進する時期があり、少なくとも IFN 単独で分裂期に対し顕著な延長作用を示すとは考え難い。IFN 添加後の augmentation を示す報告はしばしばみられるが、このような G₂-M 期の増加が関与しているかどうかは今後さらに検討が必要であろう。

制癌剤と IFN との併用については、*in vivo* において、cyclophosphamide や adriamycin との併用で有効であったとの報告が多くみられる^{33,35)}。*in vitro* においては感受性試験にもちいた細胞の種類により有効な薬剤は異なり、また各報告者によっても異なった薬剤に有用性が示されているのが現状である²⁶⁻⁴¹⁾。これらの報告のうち、Oku ら⁴¹⁾は数種類の制癌剤で、ある濃度領域において IFN と制癌剤の同時接触で antagonistic な作用を示したが、2 剤のうち 1 剤を先行投与させ次に 1 剤を接触させたものではすべて相加以上の効果を示したと報告している。彼らはこの原因として、IFN による細胞回転の変化を示唆している。Kataoka ら⁴²⁾は、H.EP# 2 細胞で、IFN- β と VCR、ADM との併用が最も有効であったが、VCR を先行投与した後に IFN を投与したものに比べ、IFN を先行投与した後に VCR を投与したもので著明な効果を認め、ADM でも軽度ではあるが同様の傾向がみられたとしている。この原因として IFN による microtubule への変化が VCR の効果を増強させた

可能性が高いと述べている。本実験においては VCR と IFN の併用ではわずかながら併用による効果を認めたが、ADM との併用においては、併用による効果はみられなかった。この原因として、Kataoka らのいうように、IFN による microtubule の変化と、VCR による microtubule への作用がわずかながら効果的に作用したということも否定できない。また IFN の先行投与により、VCR では、同時併用に比べ強い効果を示したが、ADM では同時併用と同様な効果しか示さなかった。第 1 報の結果から、ADM は S 期から G₂-M 期に集積した細胞集団に対し強い作用を示したが、IFN の先行投与により高率に S 期に集積した細胞集団に対して有意な効果として認められなかった。すなわち、IFN を S 期への同調薬剤とし、制癌剤により効果を高めることは、本実験の結果からは認められなかったことになるが、この点については前述の IFN の microtubule への作用も考慮しなければならないし、また、より多くの制癌剤で種々の濃度で検討される必要があろう。

臨床における腎細胞癌の IFN と制癌剤の併用では、vinblastine との併用が多く報告されている¹⁷⁻¹⁸⁾。わが国では、里見ら¹⁹⁾により methotrexate, vinblastine, pepleomycin との併用により有効であった症例も報告され、欧米では Figlin ら¹⁷⁾の IFN と vinblastine の併用により 15% の有効率を示す報告もみられ

る。しかし一般に臨床においては期待されたほどの効果は認められないとの見方が多く、また効果を増強させるために IFN の投与量を増加すると、副作用も増強されることが問題であることも指摘されている。IFN はその免疫学的機構を介しての作用から、biological response modifiers (BRM) としての効果が期待されていたが、直接細胞増殖抑制作用を有することや、このような副作用の面から一般の制癌剤と同様に臨床治験がすすめられてきた。しかし、その作用機構をみた場合 receptor を介しての作用であることは制癌剤との大きな相違点であり、本稿で述べた細胞回転上の変化や細胞表面の変化などの特性を利用した投与は臨床的な有効性を増す手段として有用であろうと考えられる。とくに G0, G1 期が大部分を占める腎細胞癌においては、先に述べた transition probability の低下、S 期の延長はその増殖を抑制する意味において有効に作用するとも考えられる。事実、以前より *in vitro* においては、growing state にある細胞よりも stationary state にある細胞の方が IFN に強い感受性を示すとの報告もみられる^{5,32)}。また本実験においては併用効果はみられなかったが、S 期の延長、増加を示す細胞集団に対し、S 期に特異的に作用する制癌剤との併用も一考の価値があるものと考えられる。また microtubule の変化などの特性を利用し、より有効な制癌剤との併用法の考案も可能であると考えられる。

結 語

1. ヒト腎細胞癌由来の NC-65 細胞に対し、IFN- α 単独、IFN- α と vincristine (VCR) あるいは adriamycin (ADM) との併用における増殖抑制効果と、flow cytometry (FCM) をもちい細胞回転におよぼす効果についても検討した。

2. NC-65 細胞は、IFN- α により濃度依存性に増殖抑制されるものの、比較的感受性の低い部類に属する。

3. IFN- α 単独では 6 時間から 12 時間にかけて、G1 期から S 期への移行阻害が高濃度領域で起こることが示された。IFN 接触後 24 時間から 36 時間にかけて S 期細胞の増加が顕著となり、S 期が延長したものと考えられた。

4. IFN- α と VCR との併用により軽度の増殖抑制効果の増強がみられたが、ADM との併用ではみられなかった。

IFN- α を先行投与し 24 時間後に制癌剤を接触させると、VCR との併用では高濃度で同時接触に比し増

殖は抑制されたが、ADM との時間差接触では効果は増強されなかった。

5. IFN- α と制癌剤との併用による細胞周期の変化をみると、IFN 接触後短時間での細胞回転の阻害は S 期前半から中期にみられ、低濃度では G2-M 期の増加が FCM 上顕著に示された。その後の S 期の増加は IFN 単独に比し、より顕著に長時間みられた。IFN を先行接触させた場合、このような変化が更に顕著にみられた。

6. IFN- α により S 期に高率に集積した細胞集団に対し、ADM の細胞周期特異性の効果は認められなかったが、VCR との併用では同時さらに IFN 先行接触により効果は増強され、有効な併用薬剤と考えられた。

本研究の要旨は、第 73 回日本泌尿器科学会総会 (1985) において口演された。稿を終えるにあたり、本論文の御指導、御校閲を賜りました、滋賀医科大学泌尿器科学講座友吉唯夫教授に感謝の意を表します。また、腎細胞癌のインターフェロン療法について、基礎的および臨床的な面からも、常に適切な御指導をいただいた京都大学医学部泌尿器科学教室吉田修教授に深謝いたします。さらに本実験の実施にあたり、多大な御援助、御指導を賜りました、京都大学医学部泌尿器科学教室岡田謙一郎助教授に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Gresser I and Tovey MG: Antitumor effects of interferon. *Bioch et Bioph Acta* 516: 231~247, 1978
- 2) 片岡達治: インターフェロンの抗腫瘍活性の前臨床的解析. 癌の臨床 29: 584~588, 1983
- 3) 石田名香雄・藤井敏勝: インターフェロンの抗腫瘍作用. 別冊 蛋白質・核酸・酵素 25: 236~259, 1977
- 4) Paucker K, Cantell K and Henle W: Quantitative studies on viral interference in suspended L cells. III. Effect of interfering viruses and interferon on the growth rate of cells. *Virology* 17: 324~334, 1962
- 5) Gresser I, Brouty-Boye D, Thomas M and Macieira-coelho A: Interferon and cell division. II. Influence of various experimental conditions on the inhibition of L₁₂₁₀ cell multiplications *in vitro* by interferon preparations. *J Nat Cancer Inst* 45: 1145~1153, 1970

- 6) Bradley E and Ruscetti FW: Effect of fibroblast, lymphoid, and myeloid interferons on human tumor colony formation *in vitro*. *Cancer Res* 41: 244~249, 1981
- 7) d'Hooghe MC, Brouty-Boyé D, Malaise EP and Gresser I: Interferon and cell division. XII. Prolongation by interferon of the intermitotic time of mouse mammary tumor cells *in vitro*. *Microcinematographic analysis Exp Cell Res* 105: 73~77, 1977
- 8) Gewert DR, Moore G and Clemens MJ: Inhibition of cell division by interferons. *Biochem J* 214: 983~990, 1983
- 9) O'Shaughnessy MV, Lee SHS and Rozee KR: Interferon inhibition of DNA synthesis and cell division. *Canadian J Microbiol* 18: 145~151, 1972
- 10) Macieira-Coelho A, Brouty-Boye D, Thomas MT and Gresser I: Interferon and cell division. III. Effect of interferon on the division cycle of L₁₂₁₀ cells *in vitro*. *J Cell Biol* 48: 415~419, 1971
- 11) Brouty-Boyé D, Macieira-Coelho A, Fiszman M and Gresser I: Interferon and cell division. VIII. Effect of interferon on macromolecular synthesis in L₁₂₁₀ cells *in vitro*. *Int J Cancer* 12: 250~258, 1973
- 12) 岸田綱太郎：インターフェロンの医学。講談社，1983
- 13) 岸田綱太郎：インターフェロン研究の現況。癌と化学療法 11：10~15，1984
- 14) Kirkwood JM, Harris JE, Vera R, Sandler S, Fischer DS, Khandekar J, Ernstoff MS, Gordon L, Lutes R, Bonomi P, Lytton B, Cobleigh M and Taylor IV SJ: A randomized study of low and high doses of leukocyte α -Interferon in metastatic renal cell carcinoma: The american cancer society collaborative trial. *Cancer Res* 45: 863~871, 1985
- 15) Quesada JR, Swanson DA, Trindade A and Gutterman JU: Renal cell carcinoma: Antitumor effects of leukocyte interferon. *Cancer Res* 43: 940~947, 1983
- 16) deKernion JB, Sarna G, Figlin R, Lindner A and Smith RB: The treatment of renal cell carcinoma with human leukocyte alpha-interferon. *J Urol* 130: 1063~1066, 1983
- 17) Figlin AF, deKernion JB, Maldazys J and Sarna G: Treatment of renal cell carcinoma with (human leukocyte) interferon and vinblastine in combination: A phase I-II trial. *Cancer Treat Rep* 69: 263~267, 1985
- 18) Fossà SD, De Garis ST, Heier MS, Flokkmann A, Lien HH, Salveson A and Moe B: Recombinant inerferon alfa-2a with or without vinblastine in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 57: 1700~1704, 1986
- 19) 里見佳昭・仙賀 裕・森山正敏・福島修司・古畑哲彦：進行性腎癌の MVP 療法及び MVP+IFN 療法。日泌尿会誌 76：1666，1985
- 20) 神波照夫：腎細胞癌化学療法の *in vitro* での実験的研究。1. 細胞回転からみた各制癌剤の併用効果について。泌尿紀要 33：1~14，1987
- 21) Höehn W and Schroeder FH: Renal cell carcinoma: Two new cell lines and a serially transplantable nude mouse tumor (NC 65). *Invest Urol* 16: 106~112, 1978
- 22) Baisch H, Göhde W and Linden WA: Analysis of PCP-data to determine the fraction of cells in the various phases of cell cycle. *Rad. and Environm. Biophys* 12: 31~39, 1975
- 23) Atanasiu P and Chany C: Action d'un interferon provement de collules malignessur l' infection experimental du Hamster nouveace-neparle virus. du Polyome. *CR Acad Sci (Paris)* 251: 1687~1689, 1960
- 24) Killander D, Lindahl P, Lundin L, Leary P and Gresser I: Relationship between the enhanced expression of histocompatibility antigens on interferon-treated L 1210 cells and their position in the cell cycle. *Eur J Immunol* 6: 56~59, 1976
- 25) Sokawa Y, Watanabe Y, Watanabe Y and Kawade Y: Interferon supresses the transition of quiescent 3T3 cells to a growing state. *Nature* 21: 236~238, 1977
- 26) Creasey AA, Bartholomew JC and Merigan TC: Role of G₀-G₁ arrest in the inhibition of tumor cell growth by interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1471~1475, 1980

- 27) Fuse A and Kuwata T: Inhibition of DNA synthesis of synchronized RSa cells by human leukocyte interferon. *J Natl Cancer Inst* 58: 891~895, 1977
- 28) 布施 晃: インターフェロンの細胞増殖抑制作用別冊 蛋白質・核酸・酵素, 25: 260~271, 1981
- 29) Balkwill F and Taylor JP: Interferon affects both G₁ and S+G₂ in cells stimulated from quiescence to growth. *Nature* 274: 798~800, 1978
- 30) Fuse A and Kuwata T: Effects of interferon on the human clonal cell line, RSa: Inhibition of macromolecular Synthesis. *J gen Virol* 33: 17~24, 1976
- 31) Pbeffer LM and Tamm I: Interferon inhibition of thymidine incorporation into DNA through effects on thymidine transport and uptake. *J Cellular Physiol* 121: 431~436, 1984
- 32) Tovey M Brouty-boye D and Gresser I: Early effect of interferon on mouse leukemia cells cultivated in a chemostat. *Proc Nat Acad Sci USA* 72: 2265~2269, 1975
- 33) Gresser I, Maury C and Tovey M: Efficacy of combined interferon cyclophosphamide therapy after diagnosis of lymphoma in AKR mice. *Europ J Cancer* 14: 97~99, 1978
- 34) Balkwill FR and Moodie EM: Positive interactions between human interferon and cyclophosphamide or adriamycin in a human tumor model system. *Cancer Res* 44: 904~908, 1984
- 35) Tozawa M, Kidowaki T, Tanaka T, Sawada T, Kusunoki T, Oku T and Kishida T: Effect of interferon on C1300 mouse neuroblastoma. *Cancer Treat Rep* 66: 1575~1577, 1982
- 36) Broström L-Å: The combined effect of interferon and methotrexate on human osteosarcoma and lymphoma cell lines. *Cancer Letters* 10: 83~90, 1980
- 37) 早川正道・長倉和彦・中沢和子・相川 厚・丸茂健: インターフェロン (IFN) の抗腫瘍効果に関する検討 (1) 尿路悪性腫瘍由来培養細胞に対する各種 IFN の直接作用的 増殖抑制効果について. *日泌尿会誌* 76: 734~743, 1985
- 38) 難波政義・山本省一・田中啓幹・金森利至・延原正弘・木本哲夫: 培養ヒト悪性腫瘍細胞 (HeLa) に対する各種抗癌剤の細胞増殖抑制作用のインターフェロンによる増強効果の検討. *癌と化学療法* 10: 1308~1312, 1983
- 39) Namba M, Miyoshi T, Kanamori T, Nobuhara M, Kimoto T and Ogawa S: Combined effects of 5-fluorouracil and interferon on proliferation of human neoplastic cells in culture. *Gann* 72: 819~824, 1982
- 40) Yamada H and Shimoyama M: Growth inhibitory activity of human lymphoblastoid and fibroblast interferons *in vitro*. *Gann* 74: 299~307, 1983
- 41) Oku T, Imanishi J and Kishida T: Assessment of anti-tumor cell effect of human leukocyte interferon in combination with anticancer agents by a convenient assay system in monolayer cell culture. *Gann* 73: 667~674, 1982
- 42) Kataoka T, Ohhashi F and Sakurai Y: Enhancement of antiproliferation activity of vincristine and adriamycin by interferon. *Gann* 75: 548~556, 1984

(1986年9月3日迅速掲載受付)