

Clonogenic assay を用いた腎細胞癌に対する インターフェロンの抗腫瘍効果の検討 —単独ならびに制癌剤との併用効果について—

札幌医科大学泌尿器科学教室 (主任 : 熊本悦明教授)

大 村 清 隆, 塚 本 泰 司

ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF INTERFERON-ALPHA ON HUMAN RENAL CELL CARCINOMA IN CLONOGENIC ASSAY

—SINGLE AND COMBINATION EFFECT WITH
CANCER CHEMOTHERAPEUTIC AGENT—

Kiyotaka OHMURA and Taiji TSUKAMOTO

From the Department of Urology, Sapporo Medical College

With human tumor clonogenic assay, the direct antiproliferative activity of recombinant human leukocyte interferon alpha (IFN- α) was investigated on human renal cell carcinomas (RCCs), which consisted of a human RCC cell line (ACHN), two human RCC xenografts and fifteen primary RCCs. The combination effect of IFN- α with a cancer chemotherapeutic agent was studied, as well, with the assay system.

IFN- α showed a dose-dependent antiproliferative activity against the human RCCs. The clonal growth of ACHN cell line was inhibited by less than 50 % at the concentration of 1,000 IU/ml. Two xenografts had a different sensitivity to IFN- α , in which the percent colony formation was less than 20% in RCC-3 at the concentration of 100–100,000 IU/ml, while in RCC-4 more than 50% even at the high concentration of 10,000 IU/ml.

In 15 primary tumors obtained at surgery, two types of response to IFN- α were demonstrated. One was the response in which the colony formation was inhibited in a dose-dependent manner as an increment of IFN- α concentration, and the other in which the colony formation was not sufficiently inhibited even at the high concentration of IFN- α . The dose-dependent inhibition of colony formation was demonstrated in 10 out of 15 specimens (66.7%). When the colony formation suppressed to less than 50% of control was considered to be sensitive to IFN- α , 6.7% of these 15 primary tumors were sensitive to IFN- α at 100 IU/ml, 20.0% at 1,000 IU/ml and 20.0% at 10,000 IU/ml.

Combination effects of IFN- α and with each of four different cancer chemotherapeutic agents (vinblastine, adriamycin, methotrexate, 5-fluorouracil) were investigated on the ACHN cell line. Every combination type produced a subadditive or synergistic combination effect. In particular, the combination of IFN- α with vinblastine of more than 0.1 μ g/ml concentration yielded a combination effect of statistical significance ($p < 0.001$). Even against primary tumors, the combination of IFN- α with vinblastine showed a synergistic effect in one out of every three tumors. These results suggested that the combination of IFN- α with a cancer chemotherapeutic agent would enhance the clinical effect of IFN- α alone in only a certain situation.

(Acta Urol. Jpn. 35: 737-747, 1989)

Key words: Renal cell carcinoma, Human tumor clonogenic assay, Interferon- α , Cancer chemotherapeutic agent

緒 言

インターフェロン (以下 IFN) は現在多様な生物活性をもつ cytokine の 1 つとされるが, 当初はウイルス増殖抑制物質として注目されていた。その後, 直接的な抗腫瘍効果や, 免疫能活性化による抗腫瘍効果

もあることが明らかになってきた。その抗腫瘍効果に関する基礎的研究¹⁾や臨床的研究²⁾が発表されると, その研究当初には IFN は制癌性化学療法剤の 1 つとして位置づけられ, 各方面での臨床的検討が進められてきている。

ことに腎細胞癌にある程度の抗腫瘍効果が認めら

れ、しかも他に有効な化学療法剤もまだ開発されていないことから、腎細胞癌治療剤として期待がもたれ、臨床的治療検討がひろく行われてきている。しかし、ヒトの腎細胞癌における IFN の治療効果は必ずしも充分とはいえず³⁻⁸⁾、むしろ他制癌剤との併用による効果増強が注目されるようになってきている。

そこで human tumor clonogenic assay (以下 clonogenic assay) により、株化腎細胞癌、ヌードマウス可継代腎細胞癌および腎細胞癌臨床標本を用いて、これらに対する IFN の抗腫瘍効果と、IFN と各種制癌剤の併用の意義を種々検討したのでその成績を報告する。

対象および方法

Clonogenic assay: clonogenic assay は既報^{9,10)}に従い、以下の方法にて行った。

(1) 単離細胞浮遊液の作製: 固型腫瘍は、抗生物質を含む洗浄培養液 (McCoy's-Wash) 内で無菌的に細切後酵素処理し、ステンレススチールメッシュでの濾過後、25 ゲージ注射針を通して単離細胞浮遊液とした。

(2) 軟寒天培地の作製: clonogenic assay に用いる軟寒天培地は、下層の feeder layer と上層の plating layer からなるが、これも既報^{9,10)}の方法に従い作成した。ただし株化培養細胞 (ACHN 細胞)¹¹⁾を用いた assay では、二層軟寒天培地の上層および下層のいずれの培養液も、細胞を継代維持するのに用いた Eagle's MEM を使用した。

IFN: α 型の組換え型ヒト白血球インターフェロン (rIFN- α ; Ro22-8181: 日本ロッシュ) での検討を行った。

IFN の濃度は臨床投与時の最高血中濃度が 300~1,000 IU/ml^{12,13)} であるところから、100, 1,000, 10,000 IU/ml の 3 濃度としたが、100,000 IU/ml という高濃度での検討を行った場合もある。

IFN は *in vitro* で時間依存性の作用を示す¹⁴⁾とされていることから、二層軟寒天培地の上層に前述した薬剤濃度となるように加え、培養の期間中持続的に癌細胞と接触させた。培養は 37°C, 7.5% CO₂, 水蒸気飽和の状態にて 10~14 日間行った。また、実験はいずれの場合も triplicate にて行った。

培養期間中に IFN の活性値が低下する可能性が考えられたため、IFN の活性値を経日的に検討した。Fig. 1 に示したように、14 日目の rIFN- α の活性値の低下は 50% 程度であったが、この程度の活性値の低下による影響は少ないと考えられ、培養期間中に培

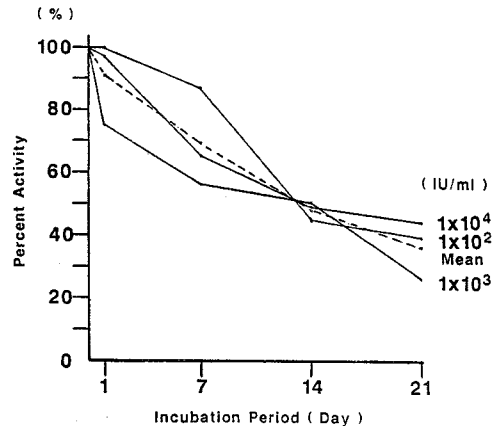


Fig. 1. Changes in activity of rIFN- α A during incubation period. Each point represents an average of three dishes.

地中に IFN の追加は行わなかった。なお IFN に対する対照薬剤としては生理食塩水を用いた。

併用制癌剤: 上記の IFN との併用を検討したものは vinblastine (VBL; 塩野義製薬), adriamycin (ADM; 協和醗酵工業), methotrexate (MTX; 日本レダリー), 5-fluorouracil (5-FU; 協和醗酵工業) の 4 薬剤である。

併用制癌剤の濃度は、各薬剤の通常投与量を 1 回で静注した場合に臨的に到達可能な血中最高濃度の 1/10~10 倍とし、VBL, ADM ではいずれも 0.01, 0.1, 1.0, 10 μ g/ml の 4 濃度、MTX では 0.5, 5.0, 50 μ g/ml の 3 濃度、5-FU では 0.6, 6.0, 60 μ g/ml の 3 濃度を用いた。

制癌剤との併用実験は、Aapro ら¹⁵⁾に準じ、それぞれの制癌剤を腎細胞癌細胞に 1 時間接触させた後、培養液にて 2 回洗浄し、rIFN- α A, 1,000 IU/ml と持続接触により先の条件下で培養した。

対象とした腎細胞癌細胞: clonogenic assay での検討対象としたものは、次の 3 種の腎細胞癌細胞である。

① 株化腎細胞癌細胞 ACHN (CRL 1611)¹¹⁾, ② 札幌医科大学泌尿器科で clear cell type の腎細胞癌症例より樹立し、3 代以上継代されたヌードマウス可継代腎細胞癌 2 株 (RCC-3, RCC-4), ③ 手術時に採取した腎細胞癌摘出標本 (15 例)。すべて腎細胞癌であることが病理組織学的に確認されている。

IFN の抗腫瘍効果の判定: IFN の抗腫瘍効果の判定は、倒立顕微鏡にてコロニー数を数え、コロニー形成率で算定した。この際 vital stain を行って、死滅したコロニーを算定から除外した¹⁰⁾。

Table 1. Assessment of drug combination effects in clonogenic assay

Synergistic	$A \geq B > [A] \times [B] > [A + B]$
Additive	$A \geq B > [A] \times [B] = [A + B]$
Subadditive	$[A], [B] > [A + B] > [A] \times [B]$
Interference	$\begin{matrix} [A] > [A + B] > [B] > [A] \times [B] \\ \text{or} & [B] > [A + B] > [A] > [A] \times [B] \end{matrix}$
Antagonistic	$[A + B] > [A] \geq [B] \geq [A] \times [B]$

(A), (B) : surviving rate for individual drugs

[A + B] : surviving rate for drugs used in combination

[A] × [B] : calculated theoretical additive effect

コロニー形成率は、無処置対照群での形成コロニー数に対する IFN 処理群での形成コロニー数を百分率で求めた。

Clonogenic assay での cytokine に対する感受性の判定基準としてはまだ確定されたものはないが、コロニー形成率が50%以下となった場合を感受性有とすることが多い^{16,17)}。Salmon¹⁸⁾によれば、clonogenic assay による制癌剤評価で従来用いられているコロニー形成率が70%以上抑制される場合よりも、コロニー形成率が50%以上抑制される場合を感受性とした方が、clonogenic assay の結果と臨床成績との相関をみた場合によく相関するという。そこで今回の検討ではコロニー形成率が50%以上の抑制を受けた場合を感受性とした。その場合コロニー形成率が50%となる IFN 濃度を求め、ED (50% effective dose) とした。

臨床標本における IFN 作用時のコロニー形成率に影響する因子の検討：臨床標本における IFN の効果、すなわち各濃度における IFN のコロニー形成率を目的変数とし、腎癌取扱い規約¹⁹⁾に基づく組織学的細胞異型度、組織学的構築型、組織学的細胞型、浸潤増殖形式、二層軟寒天培地での薬剤無処置対照の plating efficiency (播種細胞数に対する形成されたコロニー数の比)を説明変数として重回帰分析²⁰⁾を行った。

IFN と制癌剤との併用効果の評価：薬剤の併用効果の評価は Valeriote ら²¹⁾、Monparler ら²²⁾に準じて行った。すなわち、IFN および制癌剤を単独に用いた場合のそれぞれのコロニー形成率 [A] および [B] から求められる相加効果の期待値 $[A] \times [B] / 100$ と、両者を併用した場合のコロニー形成率の実測値 [A + B] とを比較し、次のような判定基準に従い判定した。

a. 相乗的 (synergistic) 効果：[A + B]が[A] × [B]より小さい場合。

b. 相加的 (additive) 効果：[A + B]が[A] × [B]に等しい場合。

c. 亜相加的 (subadditive) 効果：[A + B]が[A] × [B]より大きい場合。しかも[A + B]が[A]および[B]より小さい場合。

d. 干渉 (interference) 効果：[A + B]が[A] × [B]より大きい場合。ただし[A + B]が[A]と[B]の中間値となっている場合。

e. 拮抗的 (antagonistic) 効果：[A + B]が[A] × [B]より大きい場合。しかも[A + B]が[A], [B]の両者より大きい場合とした。

以上をまとめると Table 1 に示したとおりである。

さらに相加効果の期待値 $[A] \times [B] / 100$ と、両者を併用した場合のコロニー形成率の実測値 [A + B] の差を Drewinko ら²³⁾に従って、Z-検定により検定した。

結 果

A. IFN の抗腫瘍効果

IFN の濃度と抗腫瘍効果との関係を、用いた3種の腎細胞癌細胞で検討した。

a. ACHN 細胞に対する効果の検討

Fig. 2 に示すように、各濃度でのコロニー形成率 (平均値 ± 標準誤差) は、100 IU/ml で $76.5 \pm 5.9\%$ 、1,000 IU/ml で $36.7 \pm 5.5\%$ 、10,000 IU/ml で $18.5 \pm 1.4\%$ 、100,000 IU/ml で $13.8 \pm 5.6\%$ であった。このように ACHN 細胞に対する rIFN-αA の抗腫瘍効果は濃度依存的であった。

b. ノードマウス可継代腎細胞癌に対する効果の検討

Fig. 3 にその成績を示した。RCC-3 株では rIFN-αA の濃度が 100 IU/ml でコロニー形成率は $19.6 \pm 8.1\%$ と低値で、十分な抗腫瘍効果が認められた。100 IU/ml 以上に濃度を高くしても、コロニー形成率はそれ以上には低下しなかった。

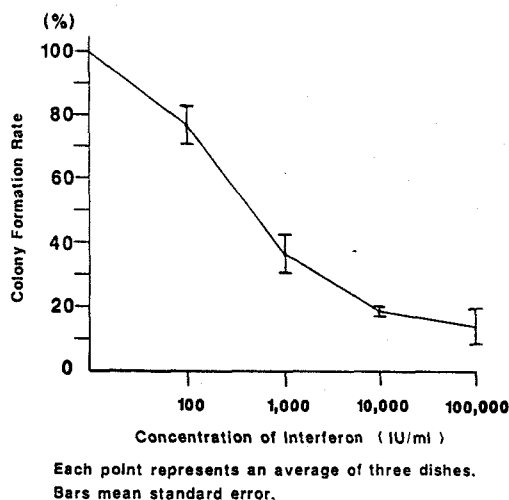


Fig. 2. Effect of recombinant interferon- α on colony formation rate of established renal cell carcinoma cell line, ACHN. Each point represents an average of three dishes. Bars mean standard errors.

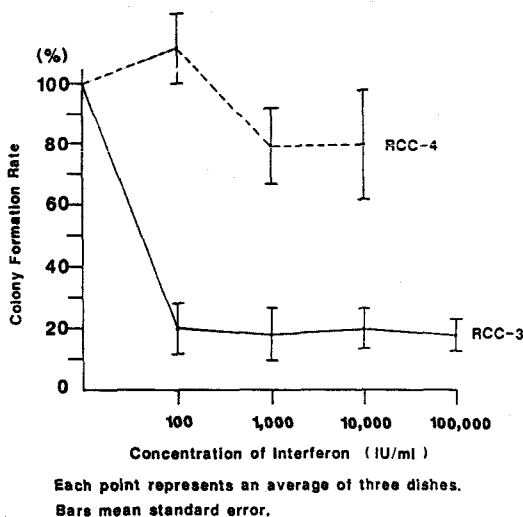


Fig. 3. Effect of recombinant interferon- α on colony formation rate of xenograft human renal cell carcinoma (RCC-3&4). Each point represents an average of three dishes. Bars mean standard error.

RCC-4 株では rIFN- α 100 IU/ml でコロニー形成率は $111.7 \pm 11.5\%$, 10,000 IU/ml でもコロニー形成率は $79.3 \pm 18.1\%$ であった. 先の RCC-3 株とは異なり, rIFN- α によってコロニー形成は十分に抑制されなかった. RCC-4 株は IFN に対する感受性は低く, 細胞により IFN 感受性に差のあることが示された.

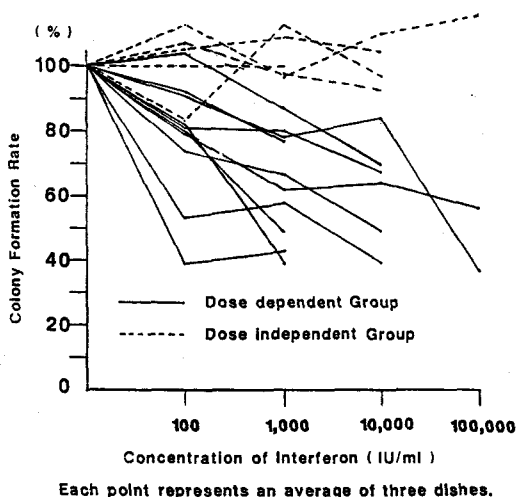


Fig. 4. Effect of recombinant interferon- α on colony formation rate of human renal cell carcinoma specimens. Each point represents an average of three dishes.

c. 臨床標本よりの腎細胞癌細胞に対する効果の検討

手術により摘出した腎細胞癌組織を細切し, 単離した癌細胞に対する rIFN- α のコロニー形成抑制効果を検討した. Fig. 4 に15例につき検討した成績を示す.

IFN の濃度依存性にコロニー形成率の低下傾向が認められる反応群 (図中の実線: 10例) と, IFN を高濃度にしてもコロニー形成率の低下傾向が認められない非反応群 (図中の点線: 5例) に分かれた. 濃度依存性の反応群は10/15 (66.7%) であった.

臨床標本15例の薬剤無処置対照群での plating efficiency と腎癌取り扱い規約¹⁹⁾に基づく病理組織学的な特徴を Table 2 に, またコロニーの形成率が50%以上低下した場合を IFN に対する感受性あり (S) と判定して, その有感受性率を IFN 濃度別に Table 3 にまとめた.

反応群の中にあってもコロニーの形成率が70%以上抑制されたものはなかった. 感受性率は 100 IU/ml で6.7%, 1,000 IU/ml で20.0%, 10,000 IU/ml で20.0%であった (Table 3).

臨床標本からの腎細胞癌細胞においても, 可継代株で認められたと同様, 感受性群と非感受性群に分かれることが明らかになった.

d. 臨床標本における IFN 作用時のコロニー形成率に影響する因子の検討

IFN の臨床標本における効果, すなわち各濃度で

Table 2. Plating efficiency of control dishes in clonogenic assay and histological characteristics of human renal cell carcinomas

Case (age-sex)	Plating efficiency ¹⁾	Grade	Architecture ²⁾	Cell type ³⁾	Infiltrative growth pattern ⁴⁾	Stage	TNMV classification			
							pT	pV	pN	pM
1 Y.H. (52-M)	0.0546	I	Tubular	Clear	β	I	2b	1a	×	0
2 O.T. (54-M)	0.019	I	Alveolar	Clear	β	I	2a	0	0	0
3 K.Y. (55-M)	0.0064	I	Alveolar	Clear	β	I	3	1a	0	0
4 S.K. (57-F)	0.127	I	Alveolar	Clear	β	II	4	1b	0	0
5 S.M. (66-M)	0.0208	I	Alveolar	Clear	α	IV	2b	1a	×	1
6 I.K. (68-M)	0.0078	II	Alveolar	Clear	α	I	2a	1a	0	0
7 H.Y. (76-M)	0.022	II	Alveolar	Clear	α	III A	3	2	0	1
8 T.T. (72-M)	0.0304	II	Tubular	Granular	β	III B	3	1a	1	0
9 K.G. (75-M)	0.059	II	Papillary	Clear	β	III A + B	4	2	2	0
10 S.K. (76-M)	0.146	II	Alveolar	Mixed	β	IV	4	1a	2	1
11 F.S. (52-M)	0.035	II	Alveolar	Clear	β	IV	2a	1a	×	1
12 S.F. (43-M)	0.108	III	Alveolar	Clear	β	III A	4	2	0	0
13 H.K. (47-M)	0.0571	III	Papillary	Clear	β	IV	2b	1a	0	1
14 S.S. (58-M)	0.11	III	Alveolar	Clear	β	IV	2b	0	0	1
15 S.K. (67-M)	0.527	III	Alveolar	Clear	β	IV	4	1a	×	1

1) Plating efficiency: number of colonies/number of cells plated; an average of three control dishes.

2) Alveolar: Alveolar type, Papillary: Papillary type, Tubular: Tubular type

3) Clear: Clear cell subtype, Granular: Granular subtype, Mixed: Mixed subtype

4) α : Expansive type, β : Intermediate typeTable 3. Sensitivity to rIFN- α in clonogenic assay for human renal cell carcinomas

Case (age-sex)	IFN concentration and colony formation rate				Clinical Response
	100 IU/ml	1,000 IU/ml	10,000 IU/ml	100,000 IU/ml	
1 Y.H. (52-M)	91.8 (R)	78.0 (R)	(-)	(-)	(-)
2 O.T. (54-M)	82.8 (R)	112.9 (R)	96.8 (R)	(-)	(-)
3 K.Y. (55-M)	90.6 (R)	78.1 (R)	84.4 (R)	37.5 (S)	(-)
4 S.K. (57-F)	52.6 (R)	58.1 (R)	39.5 (S)	(-)	(-)
5 S.M. (66-M)	113 (R)	97.1 (R)	110 (R)	116 (R)	PD
6 I.K. (68-M)	81.0 (R)	39.7 (S)	(-)	(-)	(-)
7 H.Y. (76-M)	39.4 (S)	43.1 (S)	(-)	(-)	(-)
8 T.T. (72-M)	73.8 (R)	66.6 (R)	49.3 (S)	(-)	PD
9 K.G. (75-M)	104.3 (R)	87.1 (R)	69.9 (R)	(-)	(-)
10 S.K. (76-M)	79.0 (R)	49.4 (S)	(-)	(-)	(-)
11 F.S. (52-M)	100 (R)	100 (R)	(-)	(-)	PD
12 S.F. (43-M)	78.8 (R)	61.8 (R)	63.7 (R)	55.9 (R)	NC
13 H.K. (47-M)	81.1 (R)	80.1 (R)	67.6 (R)	(-)	PD
14 S.S. (58-M)	107 (R)	96.4 (R)	92.5 (R)	(-)	(-)
15 S.K. (67-M)	105 (R)	109 (R)	105 (R)	(-)	PD
Sensitivity Rate	1/15(6.7%)	3/15(20.0%)	2/10(20.0%)	1/3(33.3%)	0/6(0%)

S (sensitive): Colony growth reduced to less than 50% of control.

R (resistant)

(-): Not examined

NC: No change

PD: Progressive Disease

の IFN に対する感受性の有無を目的変数とし, IFN 濃度, 薬剤無処置対照群での plating efficiency, 組織学的細胞異型度, 組織学的構築型, 組織学的細胞型, 浸潤増殖形式を説明変数として重回帰分析を行っ

た. 各要因の標準化偏回帰係数, F 値と寄与率(重相関係数の 2 乗ですべての分散の何パーセントが重回帰式で説明されるかを示す)を Table 4 に示した. その結果, これら 6 要因で IFN に対する感受性の 22.3%

Table 4. Result of multiple regression analysis

Factor	Standard partial regression coefficient	F value	Coefficient of determination
Cell type	0.32362	4.653	0.08603
Infiltrative growth pattern	-0.29151	3.164	0.16155
IFN concentration	0.22745	2.350	0.21532
Architecture	-0.07439	0.217	0.21854
Plating efficiency	-0.06304	0.126	0.22247
Grade	-0.00906	0.003	0.22253

が説明された。このうちF値が2.0を越える組織学的細胞型、浸潤増殖形式、IFN濃度により21.5%が説明される。

e. 感受性腎細胞癌細胞におけるEDの検討

以上の検討でみられるように、感受性細胞であってもその感受性には差がある。そこでそれぞれの感受性細胞のコロニー形成率が50%となるIFN濃度(ED₅₀)をTable 5に示した。ACHN細胞のED₅₀は625 IU/ml, RCC-3では<100 IU/mlであった。Table 2に示したIFNにいずれかの濃度で感受性のあった6例の臨床例でも、ED₅₀は100 IU/ml未満から90,182 IU/mlと幅広く分布するが、6例中3

Table 5. ED₅₀ of rIFN-αA for IFN-sensitive renal cell carcinoma cells in clonogenic assay

	Materials	ED ₅₀ (IU/ml)
	ACHN cell	652
	RCC-3	<100
	Case 7 H.Y.	<100
	Case 6 I.K.	802
Clinical materials	Case 10 S.K.	1,000
	Case 8 T.T.	1,500
	Case 4 S.K.	5,000
	Case 3 K.Y.	90,182

Table 6. Interaction of rIFN-αA and chemotherapeutic drugs on colony formation of cell line, ACHN

Used drug concentration and observed colony formation rate with drug alone (%Mean±SE)		Observed colony formation rate in combination (%Mean±SE)	Expected colony formation rate in combination (%Mean±SE)	Combined effect	P ^{a)} value
[A]	[B]	[A+B]	[A]×[B]		
rIFN-αA 1,000 (IU/ml) : 34.2±14.4	<u>VBL</u>				
	0.01 (μg/ml)	63.8±12.7	25.3±8.8	21.8±10.2	Subadditive N.S.
	0.1	66.7±16.2	4.9±2.3	22.8±11.1	Synergistic P<0.001
	1.0	19.7±3.8	2.5±0.7	6.7±3.1	Synergistic P<0.001
	10	16.7±5.8	0.7±0.1	5.7±3.1	Synergistic P<0.001
	<u>ADM</u>				
	0.01 (μg/ml)	106 ±75.0	17.2±9.4	36.3±29.8	Synergistic N.S.
	0.1	107 ±35.4	14.0±5.6	36.6±19.6	Synergistic N.S.
	1.0	37.8±6.0	10.3±5.9	12.9±5.8	Synergistic N.S.
	10	30.7±8.6	4.7±1.9	10.5±5.3	Synergistic N.S.
	<u>MTX</u>				
	0.5 (μg/ml)	130 ±69.8	18.5±7.8	44.5±30.3	Synergistic N.S.
	5.0	61.0±14.9	11.5±6.6	20.9±10.2	Synergistic N.S.
	50	16.5±2.2	8.6±6.4	5.6±2.5	Subadditive N.S.
	<u>5-FU</u>				
	0.6 (μg/ml)	84.4±59.7	28.3±7.8	28.9±23.7	Synergistic N.S.
	6.0	44.8±18.6	10.7±2.1	15.3±9.1	Synergistic N.S.
	60	27.4±6.7	3.2±1.4	9.4±4.5	Synergistic N.S.

a) P values are reported only for differences between "expected" and "observed" colony formation rate that indicate statistically significant drug synergy or antagonism.

例では ED_{50} が 1,000 IU/ml 前後であった。

B. IFN- α と制癌剤との併用効果

以上の検討から, IFN 単剤である程度の抗腫瘍効果はあるものの, その効果は必ずしも十分とは言えない。そこで VBL, ADM, MTX, 5-FU の4種の制癌剤との併用効果の検討を行った。

a. ACHN 細胞での検討

検討したその成績を Table 6 に示した。その際に各種制癌剤と併用した rIFN- αA の濃度は, 前項で検討した ACHN 細胞の ED_{50} が 652 IU/ml であったことを参考に, 1,000 IU/ml とした。この場合の rIFN- αA 1,000 IU/ml でのコロニー形成率は 34.2 $\pm$ 14.4 %であった。

VBL との併用効果

VBL 0.01, 0.1, 1.0, 10 μ g/ml の各濃度と IFN 併用でのコロニー形成率はそれぞれ 25.3 $\pm$ 8.8%, 4.9 $\pm$ 2.3%, 2.5 $\pm$ 0.7%, 0.7 $\pm$ 0.1 %であった。0.01 μ g/ml の濃度でコロニー形成率は 70 % 以上抑制されたが, その併用効果は重相加的な効果であった。しかし, 0.1 μ g/ml 以上の高濃度での併用効果はいずれも相乗的であり, コロニー形成率は 95 % 以上抑制された。しかも, 0.1 μ g/ml 以上の濃度での併用ではコロニー形成率の実測値と相加効果の期待値の差は危険率 0.1 % 以上で統計学的にも有意であった。

ADM との併用効果

ADM 0.01, 0.1, 1.0, 10 μ g/ml の各濃度と IFN 併用でのコロニー形成率はそれぞれ 17.2 $\pm$ 9.4%, 14.

0 $\pm$ 5.6%, 10.3 $\pm$ 5.9%, 4.7 $\pm$ 1.9% であった。0.01 μ g/ml の濃度での併用でも, そのコロニー形成率は 80 % 以上抑制された。いずれの濃度でも 2 剤併用時のコロニー形成率は, IFN, ADM 単剤処理によるそれぞれのコロニー形成率から求められる期待値以下であり, 相乗的な併用効果が認められた。しかし, コロニー形成率の実測値と相加効果の期待値の間には危険率 5 % で統計学的有意差は得られなかった。

MTX との併用効果

MTX 0.5, 5.0, 50 μ g/ml の各濃度と IFN 併用でのコロニー形成率はそれぞれ 18.5 $\pm$ 7.8%, 11.5 $\pm$ 6.6%, 8.6 $\pm$ 6.4% であった。5.0 μ g/ml 以下の濃度での併用では相乗的な効果であった。50 μ g/ml でコロニー形成は 90 % 以上抑制されたが, 併用効果は重相加的であった。コロニー形成率の実測値と相加効果の期待値の間には危険率 5 % で統計学的有意差はなかった。

5-FU との併用効果

5-FU 0.6, 6.0, 60 μ g/ml の各濃度と IFN 併用でのコロニー形成率はそれぞれ 28.3 $\pm$ 7.8%, 10.7 $\pm$ 2.1%, 3.2 $\pm$ 1.4% であった。いずれの濃度でもそのコロニー形成率は併用した IFN, 5-FU 単剤処理によるコロニー形成率の期待値以下であり, 相乗的な併用効果が認められた。しかし, 危険率 5 % ではコロニー形成率の実測値と相加効果の期待値との間に統計学的な有意差はなかった。

b. 手術標本での検討

すべての制癌剤で併用効果を検討するのには, 手術標本から得られる癌細胞数が不十分なことと, 前項で

Table 7. Interaction of rIFN- αA and vinblastine on colony formation of human renal cell carcinoma obtained from surgery

Case	Observed colony formation rate with rIFN- αA alone (%Mean $\pm$ SE)	Observed colony formation rate with VBL alone (%Mean $\pm$ SE)	Observed colony formation rate in combination (%Mean $\pm$ SE)	Expected colony formation rate in combination (%Mean $\pm$ SE)	Combined effect	P value
	[A]	[B]	[A + B]	[A] $\times$ [B]		
1 H.K. (1,000) ^{a)}	80.1 $\pm$ 11.7	(0.1) ^{b)} 78.0 $\pm$ 7.9	44.4 $\pm$ 4.5	62.5 $\pm$ 11.1	Synergistic	N.S.
		(1.0) ^{b)} 72.7 $\pm$ 9.6	44.0 $\pm$ 5.9	58.2 $\pm$ 11.4	Synergistic	N.S.
2 T.T. (1,000) ^{a)}	66.6 $\pm$ 22.6	(0.01) ^{b)} 91.8 $\pm$ 11.4	86.1 $\pm$ 20.7	61.6 $\pm$ 22.1	Interference	N.S.
		(0.1) ^{b)} 64.8 $\pm$ 14.0	60.1 $\pm$ 14.0	43.2 $\pm$ 17.4	Subadditive	N.S.
3 S.K. (1,000) ^{a)}	100 $\pm$ 19.1	(0.1) ^{b)} 75.6 $\pm$ 15.1	100 $\pm$ 21.5	75.6 $\pm$ 21.3	Interference	N.S.

a) Used concentration of rIFN- αA (IU/ml).

b) Used concentration of VBL (μ g/ml).

c) P values are reported only for differences between "expected" and "observed" colony formation rate that indicate statistically significant drug synergy or antagonism.

の検討で IFN と VBL との併用が統計学的にも有意な併用効果を認めたことから、VBL とだけの IFN の併用効果を検討することとした。使用した IFN 濃度は前項同様 1,000 IU/ml とした。

3 例のみの検討ではあるが、Table 7 にその結果を示した。症例 1 では VBL 0.1 μ g/ml で $44.4 \pm 4.5\%$ 、1.0 μ g/ml で $44.0 \pm 5.9\%$ というコロニー形成率であった。いずれの VBL 濃度でも相乗効果が認められ、しかも併用によってコロニーの形成率は 50% 以下となった。しかし他の 2 例ではその効果は干渉的效果あるいは重相加的效果で、十分な併用効果は認められなかった。またいずれの場合にも、危険率 5% では 2 剤併用時のコロニー形成率の実測値と相加効果の期待値に統計学的な有意差は得られなかった。

考 察

IFN の作用には種特異性があることから、ヒト由来の IFN (HuIFN) の作用を基礎的に *in vitro* で検討するには、ヒトの腫瘍細胞を用いた実験系において行わねばならない。そこでわれわれは IFN の制癌作用を検討するため、ヒト腫瘍細胞から培養樹立したヒト悪性腫瘍細胞およびヌードマウス可継代腫瘍、さらに手術的に採取したその臨床標本を用いて clonogenic assay により研究を行った。

今回はその *in vitro* での IFN の作用を腎細胞癌に焦点を絞って検討を行ったが、その結果をまとめると以下のとおりである。

- ① 腎細胞癌に対し直接的な抗腫瘍効果がある。
- ② しかしすべてのヒト腎細胞癌に IFN の効果が認められるわけではなく、腎細胞癌は IFN 感受性群と非感受性群に分かれる。
- ③ IFN に対する感受性の有無は組織学的細胞型、浸潤増殖形式、IFN 濃度により 21.5% が説明される。
- ④ 腎細胞癌の IFN 感受性群に対する DE_{50} は、検討した範囲では $<100 \sim 90,182$ IU/ml であった。
- ⑤ この IFN の制癌作用はさらに制癌剤と併用することにより、その制癌剤の抗腫瘍効果をより増強することがある。

IFN の抗腫瘍効果としては直接作用と宿主介在性の間接作用とが考えられている^{1,11,24)}。

今回の実験系は宿主の免疫系の介在しない *in vitro* の系であって、株化培養腎細胞癌細胞、ヌードマウス可継代ヒト腎細胞癌、腎細胞癌臨床標本に対してみられたコロニー形成の抑制は、IFN の直接作用の存在を証明している。

しかし、マウスでの *in vivo* 抗腫瘍実験では、*in*

vitro では IFN-resistant である 3Cl-8 細胞に対しても *in vitro* で IFN-sensitive な 745 細胞に対してと同程度の抗腫瘍効果が得られたという報告もあり²⁵⁾、宿主の免疫機構の関与も考えられる。

さて、今回われわれの検討で用いた株化培養腎細胞癌 ACHN 細胞は、Borden ら¹¹⁾ が IFN- α および β により増殖抑制をうけると報告しているが、今回われわれも rIFN- α A によりコロニー形成率は 50% 以下に抑制されることを確認した。

しかし、ヌードマウス可継代ヒト腎細胞癌株ならびに腎細胞癌の臨床摘出標本で行った検討では、必ずしも IFN によるコロニー形成抑制効果が十分でないものもある。

IFN の直接的抗腫瘍作用は IFN レセプターを介して現れるものと考えられており^{11,25,26)}、このように腎細胞癌により IFN の抗腫瘍効果に差があるのは、IFN レセプター量の差とも考えられる。

ヒト腎細胞癌細胞に対する IFN- α (rIFN- α A) の抗腫瘍効果の clonogenic assay による検討で、コロニー形成率抑制 50% 以上のものは 3/13 (23%) で、抑制 70% 以上となるとわずか 1/13 (7.7%) に過ぎなかったと Salmon ら¹⁶⁾ が報告している。また松山²⁷⁾ は、ヒト腎細胞癌細胞に対する各種 IFN の抗腫瘍効果は 6/27 (22%) にみられたと報告している。従って腎細胞癌症例の 20% 程度では IFN の抗腫瘍効果が期待できるものと考えられる。

しかし、IFN 濃度を下げ、50~100 IU/ml の低濃度で検討すると、対照群のコロニー形成数の標準誤差の 2 倍以上のコロニー増殖を示す場合があるという報告もある。この濃度で作用させた場合、Ludwig ら²⁸⁾ は腎細胞癌の 2/10 (20%) で、また松山²⁷⁾ は腎細胞癌の 2/27 (7%) でコロニー増殖の増強をみたという。

われわれの検討では RCC-4 では 100 IU/ml でやや増殖傾向がでていた。IFN 感受性症例では IFN 濃度が高くなるにつれ抗腫瘍効果が高くなっている。臨床的に IFN が抗腫瘍効果を発揮するためには、可能なかぎり高濃度の血中 IFN 濃度の維持が望ましいと考えられる。ED₅₀ の検討では、1,000 IU/ml 程度のものが多かった。しかし IFN- α の臨床投与の場合には、1 回 3,000,000 IU という一般的な投与量では、血中最高濃度は 300 IU/ml に留り、100,000,000 IU の筋肉内投与でも血中最高濃度は 1,000 IU/ml を越えない^{12,13)}とされている。1 回 10,000,000 IU 以上の高単位投与は副作用の発現率が高く、临床上は事実上投与困難である。

IFN- α の臨床第Ⅱ相試験での腎細胞癌に対する有効率は約20%³⁻⁸⁾と報告されている。今回の臨床腎細胞癌細胞に対する IFN の抗腫瘍効果の検討で 1,000 IU/ml の感受性率は3/15 (20.0%)であった。今回の実験結果ならびに臨床投与時の血中濃度から考えて、臨床成績の約20%というあたりが IFN 単独での効果の限界であろう。

さて、このように IFN 単独でこれ以上の抗腫瘍効果を期待できないとすれば、IFN と制癌剤との併用療法に期待せざるをえない。

ヒト IFN と制癌剤との併用実験については最近いくつかの報告が散見される^{15,29-36)}。Aapro ら¹⁵⁾は、各種培養細胞を用いて clonogenic assay を行い、rIFN- α A と VBL, vincristine, vindesine, vinzolidine, cis-platinum, ADM, etoposide, melphalan の8薬剤との併用効果を検討し、VBL が強い相乗作用を示したと報告している。彼らはその作用機序が VBL の microtubule への効果と IFN の細胞骨格への作用によるものと推定している。また Kataoka ら³⁴⁾も、細胞骨格への作用を有する vincristine, ADM などの制癌剤との併用が、細胞増殖抑制を増強することを報告している。

MTX に関しては、Brostrom²⁹⁾は骨肉腫の株化培養細胞を用いた実験で、なんら相乗効果を認めなかったとしているが、Slater ら³⁰⁾は、L1210 細胞担癌マウスで平均生存期間を著明に延長するとの併用効果を認めている。

5-FU については、Miyoshi ら³¹⁾は、IFN- α が 5-FU の細胞内取込を増加させ、あるいは 5-FU の細胞内代謝を阻害することにより相乗的な細胞増殖抑制効果をもたらすとしている。

今回われわれが ACHN 細胞で IFN 1,000 IU/ml に、VBL, ADM, MTX および 5-FU を併用したところ、いずれの濃度においても IFN 単独および制癌剤単独で処理した場合よりもコロニー形成率を低下させ、その抗腫瘍効果のほとんどが相乗的效果を示した。特に VBL 0.1 μ g/ml 以上の濃度との併用では、コロニー形成率の実測値と相加効果の期待値との間で、危険率 0.1% 以下の統計学的有意差が認められた。

臨床例での検討では、3例中1例で VBL との併用でコロニーの形成率は50%以下となり、IFN あるいは VBL 単剤の場合よりも 20~30%低下した。今後 IFN とそれら制癌剤との併用療法が IFN の臨床効果を増強する可能性のあることが示唆された。

しかし腎細胞癌に対する IFN と他制癌剤との併用療法の臨床報告は、現在までのところ数少なく、VBL

や ADM との併用を行った報告³⁷⁻⁴⁰⁾でも十分期待されたほどの効果は出ていないのが現状であり、今後さらに臨床検討していくべき問題点と考えている。

結 語

Clonogenic assay を用いて、腎細胞癌に対する IFN の抗腫瘍効果を検討し、以下の結果を得た。

1) IFN の抗腫瘍効果には濃度依存性がみられ、株化腎細胞癌 ACHN 細胞では 1,000 IU/ml 以上の rIFN- α A 濃度でコロニー形成率は50%以下となった。

ヌードマウス可継代腎細胞癌2系統中、RCC-3 は 100 IU/ml 以上の rIFN- α A 濃度で感受性を示したのに対し、RCC-4 は 100~10,000 IU/ml の rIFN- α A 濃度で感受性を示さなかった。

手術時採取した臨床標本15例の検討では、濃度依存性にコロニー形成率が低下する群(10例)と、高濃度でもコロニー形成率が低下しない群(5例)がみられた。腎細胞癌の濃度依存性は 10/15 (66.7%) でみられた。

2) rIFN- α A 1,000 IU/ml の濃度での、これら15例の臨床標本の感受性例は3例20.0%に留った。また重回帰分析によれば IFN に対する感受性の有無は組織学的細胞型、浸潤増殖形式、IFN 濃度により21.5%が説明された。

3) この様に IFN の抗腫瘍効果には限界があり、他の制癌剤(VBL, ADM, MTX, 5-FU)との併用効果を検討した。株化腎細胞癌 ACHN 細胞を用いての併用効果の検討では、いずれの薬剤との併用においても重相加あるいは相乗的な抗腫瘍効果の増強がみられた。特に VBL 0.1 μ g/ml 以上の濃度との併用では、危険率 0.1% で統計学的にも有意な効果の増強を認めた。臨床標本3例での VBL との併用効果の検討では 1/3 例に相乗的な抗腫瘍効果が認められたが、逆に1例では干渉的效果が認められた。併用療法が有効な例があるが、しかし必ずしもすべてに有効でないことを示していた。

文 献

- 1) Gresser I: Antitumoreffects of interferon. Adv Cancer Res 16: 97-140, 1972
- 2) Strander H, Cantell K, Carlstrom G and Jakobsson PA: Clinical and laboratory investigations on man: systemic administration of potent interferon to man. J Natl Cancer Inst 51: 733-742, 1973
- 3) Quesada JR, Swanson DA, Trindade A and Gutterman JU: Renal cell carcinoma: Antitumor effect of leucocyte interferon. Cancer

- Res 43: 940-947, 1983
- 4) 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
 - 5) Neidhart JA, Gagen MM, Young D, Tuttle R, Melink TJ, Ziccarrelli A and Kisner D: Interferon- α therapy of renal cancer. *Cancer Res* 44: 4140-4143, 1984
 - 6) 木村禰代二: 共同研究による HLBI の悪性腫瘍に対する Phase I-II study. *癌と化療* 11: 1324-1331, 1984
 - 7) 小野佳成, 大島伸一, 前田民夫, 浅野晴好, 名出瀬男, 鈴木和雄, 阿曾佳郎, 有吉 寛, 福島雅典, 太田和雄: ヒトリンパ芽球インターフェロン (HLBI) の腎細胞癌への効果. *日癌治療会誌* 18: 962-968, 1983
 - 8) Umeda T and Nijima T: Phase II study of alpha interferon on renal cell carcinoma, summary of three collaborative trials. *Cancer* 5: 1231-1235, 1986
 - 9) 大村清隆, 熊本悦明, 塚本泰司: 二層軟寒天培地を用いたスードマウス可継代ヒト尿路性器癌のコロニー形成能の検討. *日癌治療会誌* 21: 2439-2445, 1986
 - 10) 大村清隆, 熊本悦明, 塚本泰司: Clonogenic assay を用いた尿路性器癌に対する制癌剤感受性試験. *日泌尿会誌* 77: 1745-1753, 1986
 - 11) Borden EC, Hogan TF and Voelkel JG: Comparative antiproliferative activity in vitro of natural interferons α and β for diploid and transformed human cells. *Cancer Res* 42: 4948-4953, 1982
 - 12) 古江 尚: インターフェロンの投与方法と副作用—生体内動態からみて—, *癌と化療* 11: 186-193, 1984
 - 13) 田口鐵男: 各種悪性腫瘍患者に対するインターフェロンの効果について. *癌と化療* 11: 194, 204, 1984
 - 14) Yamada H and Simoyama M: Growth inhibitory activity of human lymphoblastoid and fibroblast interferons in vitro. *Gann* 74: 299-307, 1983
 - 15) Aapro MS, Albets DS and Salmon SE: Interactions of human leukocyte interferon with vinca alkaloids and other chemotherapeutic agents against human tumors in clonogenic assay. *Cancer Chemother Pharmacol* 10: 161-166, 1983
 - 16) Salmon SE, Durie BGM, Young L, Liu RM, Trown PW and Stebbing N: Effects of cloned human leukocyte interferons in the human tumor stem cell assay. *J Clin Oncol* 1: 217-225, 1983
 - 17) Brenning GA, Ahre A and Nilsson K: Correlation between in vitro and in vivo sensitivity to human leukocyte interferon in patients with multiple myeloma. *Scand J Haematol* 35: 543-549, 1985
 - 18) Salmon SE: Personal communication
 - 19) 日本泌尿器科学会, 日本病理学会, 日本放射線学会編: 腎癌取扱い規約, 第1版, pp 68-84, 金原出版, 東京, 1983
 - 20) 高木廣文: 重回帰分析多変量解析ハンドブック. 柳井晴夫, 高木廣文編: pp. 18-69, 現代数学社, 京都, 1986
 - 21) Valeriote F and Lin HS: Synergistic interaction of anticancer agents: a cellular perspective. *Cancer Chem Rep* 59: 895-900, 1975
 - 22) Momparler RL: In vitro systems for evaluation of combination chemotherapy. *Pharmacol Ther* 8: 21-35, 1980
 - 23) Drewinko B, Loo TL, Brown B, Gottlieb J A and Freireich EJ: Combination chemotherapy in vitro with adriamycin. Observations of additive, antagonistic, and synergistic effects when used in two drug combinations on cultured human lymphoma cells. *Cancer Biochem Biophys* 1: 187-195, 1976
 - 24) Billian A: The clinical value of interferons as antitumor agents. *Eur J Cancer Clin Oncol* 17: 949-967, 1981
 - 25) Belardelli F, Gresser I, Maury C and Maunoury HT: Antitumor effects of interferon in mice injected with interferon-sensitive and interferon-resistant Friend leukemia cells. I. *Int J Cancer* 30: 813-820, 1982
 - 26) 米原 伸: インターフェロンレセプターシステム, *癌と化療* 11: 44-52, 1984
 - 27) 松山豪泰: 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. *泌尿紀要* 32: 503-511, 1986
 - 28) Ludwig CU, Durie BGM, Salmon SE and Moon TE: Tumor growth stimulation in vitro by interferon. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19: 1625-1632, 1983
 - 29) Broström L-A: The combined effect of interferon and methotrexate on human osteosarcoma and lymphoma cell lines. *Cancer Letters* 10: 83-90, 1980
 - 30) Slater LM, Wetzel MW and Cesario T: Combined interferon-antimetabolite therapy of murine L1210 leukemia. *Cancer* 48: 5-9, 1981
 - 31) 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
 - 32) Miyoshi T, Ogawa S, Kanamori T Nobuhara M and Namba M: Interferon potentiates cytotoxic effects of 5-fluorouracil on cell proliferation of established human cell lines

- originating from neo plastic tissues. Cancer Letters 17: 239-247, 1983
- 33) 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
- 34) Kataoka T, Oh-hashi F and Sakurai Y: Enhancement of antiproliferation activity of vincristine and adriamycin by interferon. Gann 75: 548-556, 1984
- 35) 神波照夫: 腎細胞癌化学療法 of *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. 泌尿紀要 33: 15-26, 1987
- 36) 郷司和男, 守殿貞夫: ヒト腎細胞癌の化学療法に関する基礎的研究—Interferon と他薬剤との併用効果について—. 日泌尿会誌 78: 982-990, 1987
- 37) Figlin RA, deKernion JB, Maldazys J and Sarna G: Treatment of renal cell carcinoma with α (human leukocyte) interferon and vinblastine in combination: a phase I-II trial. Cancer Treat Rep 69: 263-267, 1985
- 38) Fosså SD, De Garis ST, Heier MS, Flokkmann A, Lien HH, Salveson A and Moe B: Recombinant interferon alfa-2a with or without vinblastine in metastatic renal cell carcinoma. Cancer 57: 1700-1704, 1986
- 39) Muss HB, Welander C, Caponera M, Reavis K, Cruz JM, Cooper R, Jackson Jr DV, Richards II F, Stuart JJ, Spurr CL, White DR, Zekan PJ and Capizzi RL: Interferon and doxorubicin in renal cell carcinoma. Cancer Treat Rep 69: 721-722, 1985
- 40) Sarosy GA, Brown TD, VonHoff DD, Spiegel RJ, Golando JP, Beougher KL, Kuhn JG and Kisner DL: Phase I study of α_2 -interferon plus doxorubicin in patients with solid tumors. Cancer Res 46: 5368-5371, 1986
(1988年12月5日迅速掲載受付)