

担頭蓋内腫瘍マウスにおけるインターフェロン療法と Natural Killer 活性

京都大学脳神経外科
*滋賀医科大学脳神経外科

大塚 信一, 須田 金弥*, 山下 純宏
武内 重二, 半田 肇

〔原稿受付：昭和57年9月30日〕

Interferon Therapy and Natural Killer Activity in Intracranial Tumor-Bearing Mice

SHIN-ICHI OTSUKA, KINYA SUDA*, JUNKOH YAMASHITA
JUJI TAKEUCHI, HAJIME HANDA

Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School

*Department of Neurosurgery, Shiga Medical School

Effect of interferon (IFN) on survival time and natural killer (NK) activity of spleen cells was studied in intracranial tumor-bearing mice. IFN therapy was started 3 days after the intracranial transplantation of 203-glioma cells in C57BL mice. 1×10^5 U of IFN were administered intraperitoneally 4 times a week for 5 weeks. There was no remarkable effect of IFN therapy on survival time in intracranial tumor-bearing mice. NK activity of spleen cells in these mice was serially examined by the method of ^{51}Cr release assay. NK activity of spleen cells in intracranial tumor-bearing mice treated with IFN increased after the administration of IFN and high level of NK activity was maintained during IFN therapy. But NK activity rapidly decreased to the same level of intracranial tumor-bearing mice without IFN therapy one week after the termination of IFN therapy. In this study there seemed to be no correlation between the increase of NK activity and the anti-tumor effect of IFN.

1. はじめに

近年、インターフェロン (IFN) の抗腫瘍効果が明らかにされ³⁾, すでに臨床面でも種々の悪性腫瘍に対す

る治療への応用が開始されている^{1,2,5)}. 脳腫瘍に対する臨床応用も行なわれているが^{12,18)}, 我々は、マウスの頭蓋内移植腫瘍モデルを用いて、頭蓋内腫瘍に対する IFN の効果と、IFN の宿主の免疫系を介する間

Key words: Intracranial Tumor, Interferon, Natural Killer, ^{51}Cr release assay, 203-glioma.

索引語: 頭蓋内腫瘍, インターフェロン, ナチュラルキラー, ^{51}Cr 放出細胞障害試験, 203 グリオーマ

Present address: Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University 54 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto, 606 Japan.

接作用の中で、その抗腫瘍効果に一役を担っていると考えられている natural killer (NK) 細胞の活性の変動について検討したので報告する。

2. 材料, 方法

実験に用いた腫瘍は、C57BL マウスの脳内に 20-methylcholanthrene を注入して誘発した 203-glioma で、動物は、C57BL 4 週令雄を使用した。担頭蓋内腫瘍マウスは、マウスの皮下に移植継代している腫瘍を摘出し、0.1%トリプシン、0.01% EDTA で処理して細胞浮遊液とし、Hamilton microinjector を用いて、腫瘍細胞 5×10^5 個をマウスの右前頭部皮質下に経皮的に注入して作製した。

IFN は、マウスインターフェロン(比活性 1.58×10^6 U/mg protein, 東レ株式会社より提供された)を、マウス 1 匹当たり、1 回 1×10^5 U を、腫瘍移植後 3 日目より、週 4 回の割合で、計 19 回、5 週間にわたり腹腔内投与した。

マウスの spleen cell の YAC-1 細胞 (A 系マウス由来の lymphoma) に対する NK 活性を、腫瘍移植後 4 日目、1 週間目、11 日目、2 週間目、3 週間目、4 週間目、5 週間目、および IFN 投与終了後 1 週間目の計 8 回測定した。NK 活性の測定は、Fig. 1 に示したように Herberman らの方法⁷⁾ に準じて、 ^{51}Cr release assay で行なった。この方法について簡単に述べると、

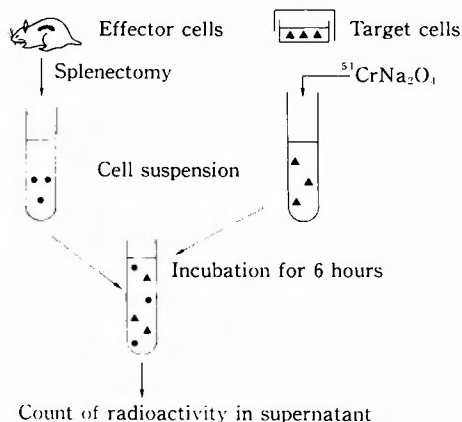


Fig. 1. The method of ^{51}Cr release assay for NK activity of spleen cells in mice. Effector cells (spleen cells) and target cells (YAC-1 cells) labelled with ^{51}Cr were mixed at various ratios and incubated for 6 hours at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 . After incubation, radioactivity of supernatant was counted in a well-typed gamma counter.

マウスより無菌的に spleen を摘出、細切し、tris- NH_4Cl 液にて赤血球を溶血除去し、spleen cell 浮遊液を作製し、effector cell とした。target cell, YAC-1 細胞を $1 \times 10^7/\text{ml}$ に調製し、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear NEZ-30) を $100 \mu\text{Ci}$ 加え、 37°C , 50 分間反応させた後、RPMI 1640 液で 3 回洗浄し、 $1 \times 10^5/\text{ml}$ に調整して、試験管 (Falcon 2003) に $5 \times 10^4/0.5 \text{ ml}$ 加えた。これに上記の effector cell を培養液 0.5 ml に種々の濃度に調整して加え、 37°C , 5% CO_2 下で 6 時間混合培養した。混合培養後、300 G, 10 分間遠心し、上清 0.5 ml をとり、gamma counter (ALOKA AUTO WELL GAMMA SYSTEM ARC-500) で放射能活性を測定し、次により算出した % specific ^{51}Cr release を NK 活性とした。

$$\% \text{ specific } ^{51}\text{Cr} \text{ release} = \frac{\text{ER} - \text{SR}}{\text{MR} - \text{SR}} \times 100$$

ER: experimental release; 被検サンプルより放出, SR: Spontaneous release; target cell のみ培養したもの, MR: maximum release; NP-40 detergent を含む培養液で培養したもの, assay は各群 2 匹ずつのマウスの spleen を合わせ、duplicate で行なった。Fig. 2 は、種々の target cell と effector cell の比 (T:E ratio) における正常 C57BL マウスの spleen cell の、YAC-1 細胞に対する cytotoxicity を示したものであるが、T:E ratio に応じた dose dependent の NK 活性が認められ、今回の実験では T:E ratio は 1:50 で行なった。なお

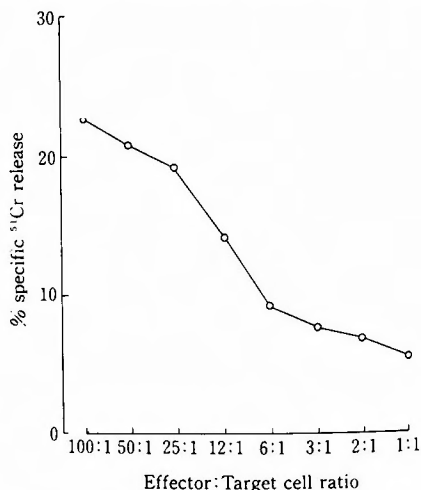


Fig. 2. NK activity of spleen cells in normal mice. NK activity of spleen cells from normal mice are shown in relation to various effector to target cell ratios.

assay に使用した培養液は、10% fetal calf serum 添加 RPMI 1640 に 20 mM Hepes (N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethenesulfonic acid) を加えたものを用いた。

以上の方法により、正常マウス、無処置の担頭蓋内腫瘍マウス、IFN 投与を行なった担頭蓋内腫瘍マウスの各群で、IFN による延命効果、体重変化および spleen cell の NK 活性の変動について検討した。

3. 結 果

Fig. 3 に示したように、無処置の担頭蓋内腫瘍マウスは、腫瘍移植後第5週目中頃から腫瘍死しはじめ、第9週初めまでに全例死亡した。IFN 投与を行なった担頭蓋内腫瘍マウスは、第5週目中頃から死亡しはじめ、第11週目まで生存したマウスもいたが、全例第11週終りまでに腫瘍死した。IFN 投与群で median survival time が多少長い傾向はあるものの、両群の生存期間に関して統計処理 (Cox Mantel test) を行なうと有意差はなく、本実験で行なった投与方法、投与量では IFN による延命効果は認められなかった。また両群での体重変化にも差は認められず、IFN 投与による体重減少は特に認められなかった。

spleen cell の NK 活性の変動は、Fig. 4 に示したように、正常マウスでは、T:E ratio 1:50 では、約20%の % specific ^{51}Cr release が認められた。無処置の担頭蓋内腫瘍マウスでは、腫瘍移植後4日目、1週間目

には約45%の % specific ^{51}Cr release が認められ、正常マウスに比較し明らかに上昇が認められたが、11日目には低下し、以後は正常マウスとほぼ同様に差は認められなかった。これに対し、IFN 投与を行なった担頭蓋内腫瘍マウスは、初期から高い NK 活性を示し、腫瘍移植後11日目にはやや低下したものの、IFN 投与終了時まで約40%の % specific ^{51}Cr release が認められ、無処置の担頭蓋内腫瘍マウスより明らかに高かったが、IFN 投与終了後1週間目には低下し差は認められなくなった。このように spleen cell の NK 活性は、腫瘍移植により上昇を認めるが、移植後11日目には低下し、以後は正常マウスと有意差は認められなかった。IFN 投与により NK 活性は明らかに上昇し、本実験の投与方法では投与終了時まで高い NK 活性が持続したが、投与終了後1週間目には低下し、無処置のマウスと差は認められなくなった。

4. 考 案

インターフェロンはウィルス増殖抑制因子として報告された⁹⁾が、その後の研究で多彩な生物学的作用が明らかにされ、特にその腫瘍細胞増殖抑制作用⁹⁾は注目を集め、ヒトの悪性腫瘍に対する抗腫瘍効果も期待され、すでに種々の悪性腫瘍に対する臨床応用が行なわれている^{1,2,5)}。IFN の抗腫瘍効果に関する動物実験の報告は多く、Gresser ら⁴⁾は、AKR マウスの lymphoma に対する効果について、また戸澤ら¹⁰⁾は、マ

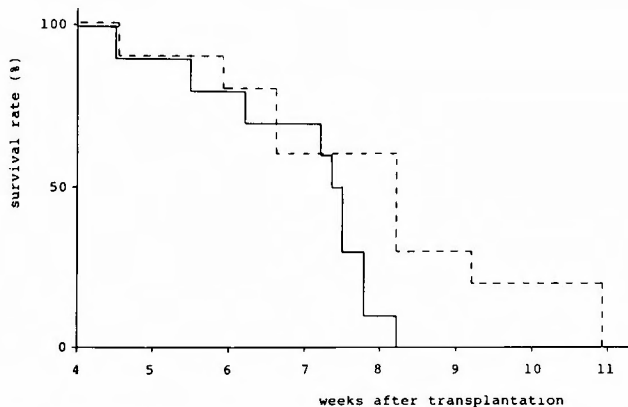


Fig. 3. Effect of IFN therapy on survival time in intracranial tumor-bearing mice.

(—) intracranial tumor-bearing mice without IFN therapy

(---) intracranial tumor-bearing mice with IFN therapy

Each group consisted of 10 mice.

IFN therapy was started 3 days after intracranial transplantation of tumor.

1×10^5 U of IFN were administered intraperitoneally 4 times a week for 5 weeks.

There was no remarkable effect of IFN therapy on survival time in intracranial tumor-bearing mice.

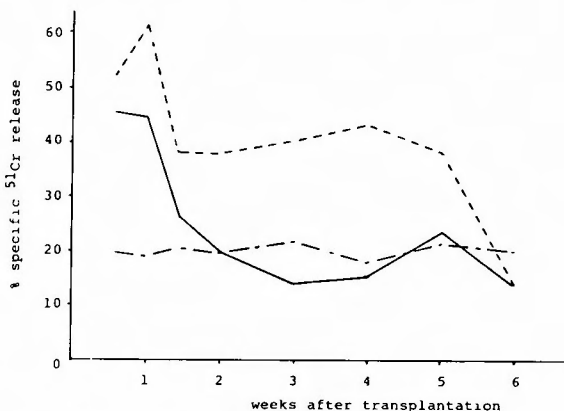


Fig. 4. Change of NK activity of spleen cells during IFN therapy in intracranial tumor-bearing mice.

(---) normal mice

(—) intracranial tumor-bearing mice without IFN therapy

(····) intracranial tumor-bearing mice with IFN therapy

The target to effector cell ratio was 1 : 50.

About 20% of % specific ^{51}Cr release was observed in normal mice. In intracranial tumor-bearing mice without IFN therapy, NK activity increased 4 days after transplantation and high level of NK activity continued until 7 days after transplantation. But 11 days after transplantation, NK activity decreased to the same level of normal mice. In intracranial tumor-bearing mice treated with IFN, NK activity increased 4 days after transplantation and high level of NK activity was maintained during 5 week course of IFN therapy. But NK activity rapidly decreased to the same level of intracranial tumor-bearing mice without IFN therapy one week after the termination of IFN therapy.

ウス神経芽細胞腫に対する効果について報告している。我々は、悪性脳腫瘍に対する IFN の臨床応用にあたり、マウスの頭蓋内腫瘍に対する IFN の抗腫瘍効果について検討した。この結果は前述の如く、今回の実験で用いた 203-glioma に対しては、腫瘍移植後 3 日目より、1 回 1×10^5 U/週 4 回、5 週間、計 19 回腹腔内投与という投与方法、投与量では、IFN によるはっきりとした抗腫瘍効果は認められず、生存期間に関する検討では延命効果は認められなかった。

IFN の宿主の免疫系を介する抗腫瘍作用の 1 つに NK 活性増強作用¹⁷⁾がある。NK 細胞は、特定の免疫刺激を受けていない正常の生体の末梢血やリンパ系組織内に本来存在しており、in vitro で、ある種の腫瘍細胞に対して cytotoxicity を示す細胞として、1973 年頃から報告され始めた¹⁴⁾。従来、生体は種々のウィルスや腫瘍細胞などによる免疫学的刺激を受けることによって、これらに対して特異的な免疫応答を示し、その中で特異的細胞障害性 T リンパ球が中心的役割を果たしていると考えられてきたが、正常な T 細胞機能を欠くヌードマウスで NK 活性が高く⁶⁾、しかも他の純系マウスと比較しても癌自然発生率に差がないこと

¹¹⁾ や、NK 細胞が選択的に欠損しているページマウスは、ある種の腫瘍に対する抵抗性が低いこと⁹⁾、また高率に腫瘍の遠隔転移をおこす¹⁵⁾ ことなどから、NK 細胞が生体内で免疫監視機構に関与し、腫瘍に対する免疫学的抵抗性の一部を担っているのではないかと考えられるようになった。in vivo において NK 細胞の抗腫瘍効果を認めたという報告もある¹⁰⁾。この NK 細胞の IFN による活性増強作用は、マウスやヒトで認められている^{12, 13, 18)}。我々は、今回の実験で IFN 投与を行なった担頭蓋内腫瘍マウスの spleen cell の NK 活性を測定した結果、IFN 投与前に比較し、投与後は NK 活性の上昇が認められ、投与期間中は NK 活性の高値が持続したが、抗腫瘍効果は認められず、今回の IFN 療法では、IFN による NK 活性の上昇と抗腫瘍効果は並行しなかった。NK 活性上昇による腫瘍増殖抑制効果は、それほど大きなものではないと考えられ、今後増殖力の弱い腫瘍、腫瘍量の少ない場合での IFN の NK 活性増強作用と抗腫瘍効果との関係について検討する必要があると考える。またさらに比活性の高い IFN の大量投与が可能となれば、より良い抗腫瘍効果が期待できると思われる。

References

- 1) Blomgren H, Cantell K, et al: Interferon therapy in Hodgkin's disease. *Acta Med Scand* **199**: 527-532, 1976.
- 2) 江崎幸治, 岡部健一, 他: 各種悪性腫瘍に対するヒト線維芽細胞インターフェロンの臨床実験. *癌と化学療法* **9**: 31-37, 1982.
- 3) Gresser I: Anti tumor effects of interferon. *Adv. Cancer Res* **16**: 97-140, 1972.
- 4) Gresser I, Maury C, et al: Interferon and murine leukemia. VII. Therapeutic effect of interferon preparations after diagnosis of lymphoma in AKR mice. *Int J Cancer* **17**: 647-651, 1976.
- 5) Gutterman JU, Blumenschein GR, et al: Leukocyte interferon induced tumor regression in human metastatic breast cancer, multiple myeloma, and malignant lymphoma. *Ann Int Med* **93**: 399-406, 1980.
- 6) Herberman RB, Nunn ME, et al: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer* **16**: 230-239, 1975.
- 7) Herberman RB: Cell-mediated immunity to tumor cells. *Adv Cancer Res* **19**: 207-263, 1979.
- 8) Isaacs A, Lindenmann J: Virus interference. I. The interferon. *Pro Royal Soc London* **147**: 258-267, 1957.
- 9) Karre K, Klein GO, et al: Low natural in vivo resistance to syngeneic leukaemias in natural killer-deficient mice. *Nature* **284**: 624-626, 1980.
- 10) Kasai M, Leclerc JC, et al: Direct evidence that natural killer cells in nonimmune spleen cell populations prevent tumor growth in vivo. *J Exp Med* **149**: 1260-1264, 1979.
- 11) Maguire H, Outzen HC, et al: Invasion and metastasis of a xenogeneic tumor in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **57**: 439-442, 1976.
- 12) 永井政勝, 新井紀元: 悪性脳腫瘍に対するインターフェロン治療の現状と将来. *脳外* **10**: 463-476, 1982.
- 13) Senik A, Gresser I, et al: Enhancement by interferon of natural killer cell activity in mice. *Cell Immunol* **44**: 186-200, 1979.
- 14) Takasugi M, Mickey MR, et al: Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res* **33**: 2898-2902, 1973.
- 15) Talmadge JE, Meyers KM, et al: Role of NK cells in tumor growth and metastasis in beige mice. *Nature* **284**: 622-624, 1980.
- 16) 戸澤睦彦, 木戸脇卓郎, 他: マウス神経芽細胞腫に対するインターフェロンの抗腫瘍効果. *医学のあゆみ* **118**: 279-281, 1981.
- 17) Trinchieri G, Santoli 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 antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis. *J Exp Med* **147**: 1314-1333, 1978.
- 18) 上田 聖, 平川公義, 他: Interferon による悪性脳腫瘍の治療. *脳外* **10**: 149-154, 1982.