

研 究

IL-12 / IL-18のマウス扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果の検討

北畠 顕良

岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任：関山 三郎 教授)

(受付：2001年12月27日)

(受理：2002年1月7日)

Abstract : Interleukin-12 (IL-12) and interleukin-18 (IL-18) exhibit strong anti-tumor effects, and induce cytokines with many similarities in function, such as induction of IFN- γ production. Concomitant administration of IL-12 and IL-18 may increase the effects. In this study, we used squamous cell carcinoma that spontaneously developed in inbred strain WHT/Ht mice. IL-12 and IL-18 were administered alone or concomitantly to tumor-bearing mice, and the antitumor effects of the cytokines were compared. As a result, the tumor growth was inhibited by IL-12 and IL-18, and prolonged survival. IFN- γ production was also increased. On measurement of cytotoxic activity and NK activity, administration of IL-12 and IL-18 increased the activities. All these effects were stronger in the concomitant administration group than the single administration groups, but body weight decreased in the concomitant administration group.

The above findings suggested that the antitumor effects of IL-12 and IL-18 are exerted via T cells and NK cells, which increase IFN- γ production and enhance cellular immunity.

Key words : IL-12, IL-18, IFN- γ , cytotoxic activity, NK activity

緒 言

近年 interleukin-12 (IL-12), interleukin-18 (IL-18) などの強い抗腫瘍効果を有するサイトカインの発見により, 癌の免疫療法に関する関心が高まりつつある。IL-12 は 1989 年, Kobayashi ら¹⁾ により ヒト B 細胞株 RPMI-8866 培養上清から interferon- γ (IFN- γ) の産生を誘導するサイトカインとして発見された。当初はその生物活性より natural killer cell

stimulatory factor (NKSF) と命名されたが, 後に Gately ら²⁾ により cytotoxic lymphocyte maturation factor (CLMF) として単離された因子が NKSF と同一の一次構造を持つことがわかり, これらは IL-12 として総称されるようになった。IL-18 は 1995 年, Okamura ら³⁾ により エンドトキシンショックモデルの系でマウス血中より IFN- γ 産生を誘導する因子として発見されたサイトカインである。これらのサイトカインは IFN- γ 産生誘導のほか, Th 1 細胞へ

Antitumor effect of IL-12 / IL-18 against murine squamous cell carcinoma.

Akira KITABATAKE

Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University, 1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

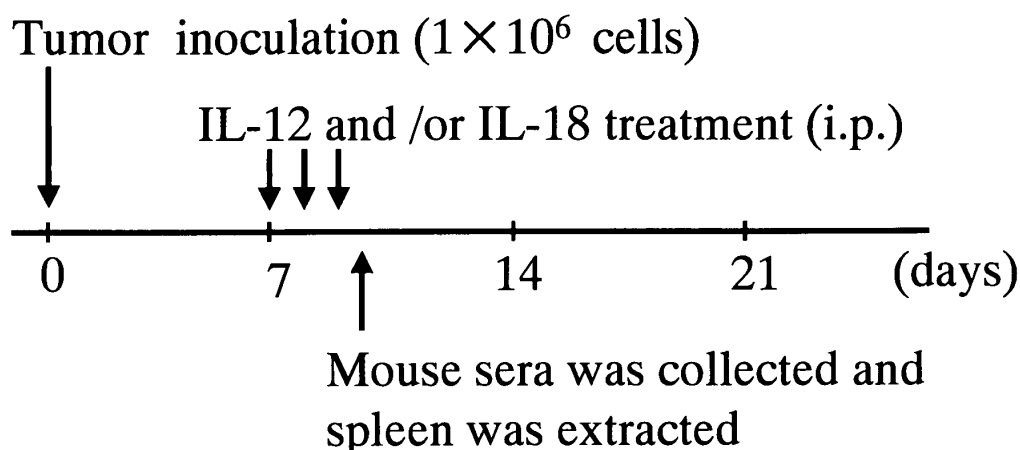


Fig. 1. This figure illustrates the schedule of medicine medication. This figure shows the schedule of cytokines administration and an experiments. Five mice in each group were inoculated in the back with 1×10^6 of murine squamous cell carcinoma cells on day 0. Mice received daily intraperitoneally injections of either normal saline, IL-18 ($1 \mu\text{g}/\text{day}$), IL-12 ($0.5 \mu\text{g}/\text{day}$), or IL-12 combined with IL-18 ($0.5 \mu\text{g}$ IL-12 and $1 \mu\text{g}$ IL-18/ day) on day 7 to 9. Mouse sera for cytokine measurement and spleen cells for cytotoxicity were collected 24hour after the third injections.

の分化促進やNK活性増強作用をもち⁴⁾、細胞性免疫の活性化に重要な役割を果たしていると考えられている。IL-12とIL-18は単体での投与によっても抗腫瘍効果を発揮するが⁵⁻⁸⁾、併用で投与するとその効果は増強する^{4,9)}。しかし、副作用が致死的であるとの報告もある¹⁰⁾。これらの研究は悪性黒色腫や肉腫を対象とするものがほとんどで、扁平上皮癌に関するものは少ない。

本研究では、近交系 WHT/Ht マウスに自然発生した可移植性の扁平上皮癌を用いて IL-12, IL-18の抗腫瘍効果について検討を行った。

材料および方法

1. 実験動物

岩手医科大学歯学部口腔外科学第2講座にて兄妹交配により、近交系として維持している WHT/Ht マウス、雌の8~12週齢(体重28~32g)を1群あたり5匹とし、水と固形試料(オリエンタル酵母工業)は自由に摂取させた。

2. 腫瘍の性状

近交系 WHT/Ht マウスに自然発生し、胸部皮下に継代移植している扁平上皮癌細胞を使用した。この腫瘍は、tumorigenic dose rate 50 (TD₅₀) 値が14.4と極めて低免疫原性である¹¹⁾。

3. 細胞浮遊液の調整

1) 腫瘍細胞浮遊液

近交系 WHT/Ht マウスに継代移植している腫瘍を無菌的に採取し、滅菌した少量の phosphate buffer saline (PBS, GIBCO) を加え剪刀にて細切し、#150白金メッシュで濾過した。これに PBS を加え細胞を洗浄し、0.25% trypsin (GIBCO) を加え攪拌した後、PBS で 800rpm, 3回遠心洗浄し、PBS に再浮遊させた。生細胞数の算定は0.2% trypan blue で染色し、その際の細胞の viability は各ロットとも90%以上であった。細胞浮遊液は、血球計算板上で生細胞数を算定した後、PBS で $1 \times 10^7/\text{ml}$ 個に調製した。

2) 脾細胞浮遊液

IL-12, IL-18最終投与の24時間後にマウスを屠殺し、無菌的に脾臓を摘出し、非働化した10% fetal bovine serum (GIBCO), ストレプトマイシン硫酸塩 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ (大日本製薬) およびペニシリンGカリウム $100 \text{U}/\text{ml}$ (大日本製薬) 添加 RPMI-1640 (GIBCO, 以下、培養液とする) を入れたガラスシャーレ上でピンセットと注射針を用いてほぐし、#150白金メッシュにて濾過し単細胞とした。これを PBS で $500 \times \text{g}$, 3回遠心洗浄したのち、培養液に再浮遊させ、0.2% trypan blue 染色を行い、生細胞を算定し一定数に調整した。

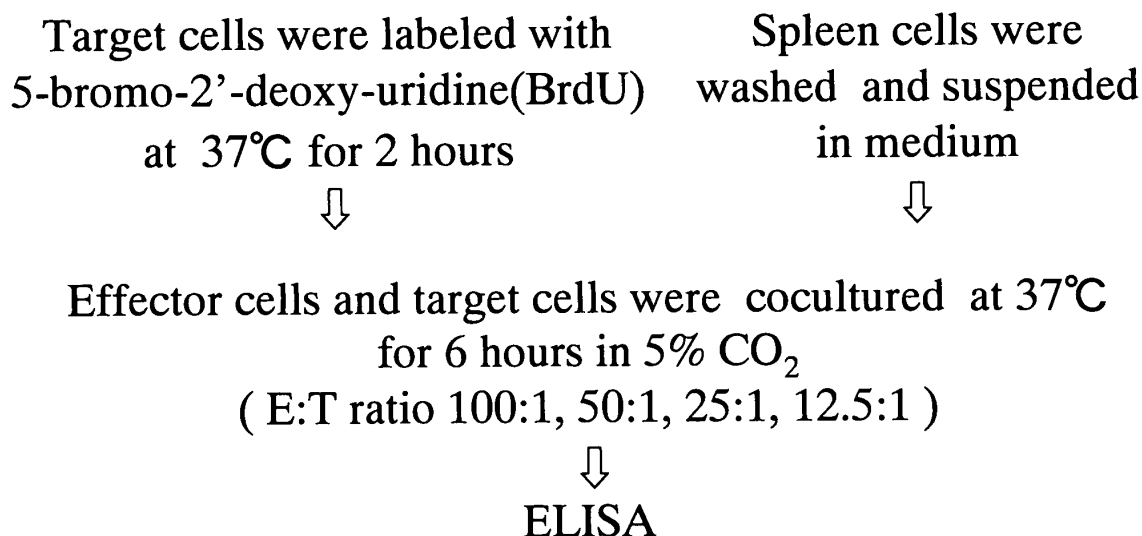


Fig. 2. The method of cytotoxicity assay

3) YAC-1 細胞¹²⁾

YAC-1 細胞は大日本製薬から購入したものを使用した。継代培養した YAC-1 細胞を PBS で 500×g, 3 回遠心洗浄したのち, 培養液に再浮遊させ, 0.2% trypan blue 染色を行い, 生細胞を算定し一定数に調整した。

4. 実験プロトコール (Fig. 1)

1) 自然経過における経日的変化

(1) 腫瘍体積の測定

1 × 10⁶個 / 0.1ml に調製した腫瘍細胞浮遊液をマウス背部皮下に移植し, 経日的に腫瘍の体積を測定し, 併せて生存日数を観察した。腫瘍体積は長径 (a) と短径 (b) をノギスを用いて計測し, $a \times b^2 \times 0.5$ の式により算出した。

(2) サイトカインの投与

interleukin-12 mouse recombinant (IL-12) は Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo) より, interleukin-18 mouse recombinant (IL-18) は医学生物研究所 (名古屋) より購入して実験に使用した。一回投与量は IL-12 は 0.5 μg/body, IL-18 は 1.0 μg/body とし, 腫瘍移植後 7 日目から 3 日間, 24 時間ごとに連続して腹腔内投与した。

実験群は IL-12 単独投与群 (以下, IL-12 投与群とする), IL-18 単独投与群 (以下, IL-18 投与群とする), IL-12, IL-18 併用投与群 (以下, 併用投与群とする) および対照群の 4 群とし, 対

照群には生理的食塩水を投与した。

2) 産生 IFN-γ および IL-4 の測定

IFN-γ ELISA kit および IL-4 ELISA kit (BIOSOURCE INTERNATIONAL) を用いて血清中の IFN-γ および IL-4 を測定した。

血清は, IL-12, IL-18 最終投与の 24 時間後, マウスをエーテル麻酔下に心臓穿刺により全採血し, 3,000rpm, 10 分で遠心分離した。これを kit 添付の IFN-γ 抗体および IL-4 抗体でコーティングされた 96 穴マイクロプレートに移し 37°C 2 時間インキュベート後, Biotin conjugate を加え室温 30 分インキュベート, 続いて streptavidine-HRP を加え室温 30 分インキュベートした。その後 tetramethyl-benzidine 基質にて発色させ (室温 30 分), 反応停止液を加えマイクロプレートリーダー (MTP-300, CORONA ELECTRIC) を用い, 波長 450nm で吸光度 (optical dose, OD) を測定した。測定はそれぞれ duplicate で行った。

3) 細胞傷害活性の測定 (Fig. 2)

各群マウス脾細胞の同系腫瘍細胞および YAC-1 細胞に対する細胞傷害活性を cellular DNA fragmentation ELISA 法¹³⁻¹⁵⁾で測定した。

(1) 標的細胞の標識

細胞培養用フラスコ (Falcon) 中の同系腫瘍細胞および YAC-1 細胞それぞれ 2 × 10⁵/個に

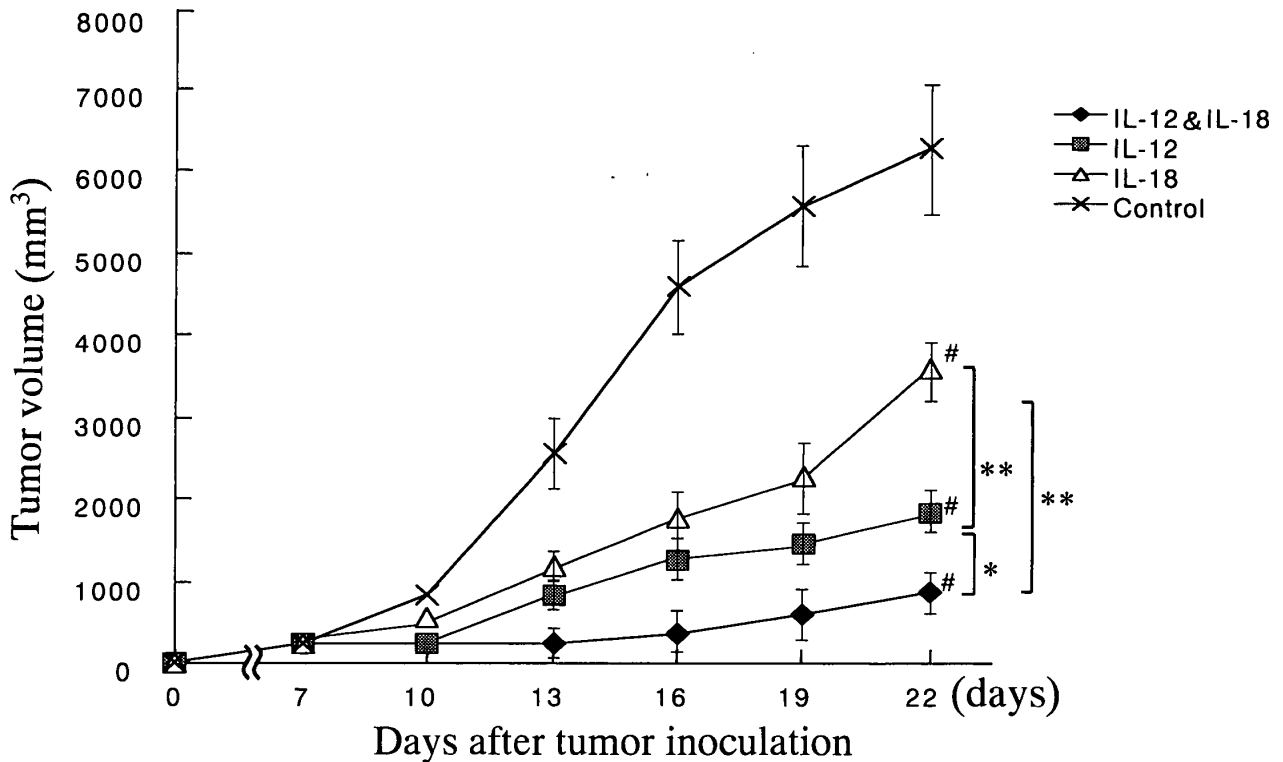


Fig. 3. This figure illustrates tumor growth curves of three experimental groups and control. Five mice in each group were inoculated in the back with 1×10^6 of murine squamous cell carcinoma cells on day 0. Mice received daily intraperitoneal injections of either normal saline, IL-18 ($1 \mu\text{g}/\text{day}$), IL-12 ($0.5 \mu\text{g}/\text{day}$), or IL-12 combined with IL-18 ($0.5 \mu\text{g}$ IL-12 and $1 \mu\text{g}$ IL-18/day) on day 7 to 9. Each point represents tumor volume. Vertical bars indicate standard deviation. The significant differences between each groups were determined by applying Fisher's PLSD ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$). #: Significant difference from control ($p < 0.01$).

対し $1 \mu\text{M}$ の 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) を加え、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ で 2 時間標識し、 $250 \times g$ 、10 分洗浄し培養液に再浮遊させた。

(2) BrdU release assay

96穴丸底マイクロプレート (Falcon) に標的細胞 (target cell, T) として、BrdU で標識した腫瘍細胞および YAC-1 細胞を 2×10^4 個 / 0.1 ml に調整し分注した。effector 細胞 (E) として、各群のマウス脾細胞を E/T 比 $100:1$ 、 $50:1$ 、 $25:1$ 、 $12.5:1$ の割合で混合し総量 0.2 ml とした。その後、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ で 6 時間培養し、上清 $100 \mu\text{l}$ を抗 DNA 抗体でコーティングしたマイクロプレートに移し室温 90 分インキュベートし、マイクロプレートを洗浄後、micro wave (500W 、5 分) を照射した。続いて抗-BrdU ペルオキシターゼを加え室温 90 分インキュベートした後、tetramethyl-benzidine 基

質で発色させ、反応停止液として濃硫酸を加え、MTP-300 を用い、波長 450 nm にて OD を測定した。標的細胞からの自然遊離値、最大遊離値の測定は effector 細胞の代わりにそれぞれ、RPMI-1640、 0.2% Triton X (Sigma) を加えて行った。測定は各群 triplicate で行い、細胞傷害活性は以下の式より求めた。

$$\text{細胞傷害活性 (\%)} = \left\{ \frac{\text{実験群遊離 OD} - \text{自然遊離 OD}}{\text{最大遊離 OD} - \text{自然遊離 OD}} \right\} \times 100$$

4) マウスの体重に関する影響

全身毒性の指標として、IL-12、IL-18 最終投与 24 時間後の屠殺時に各群マウスの体重を計測した。

5. 統計学的検討

統計学的処理は Fisher's PLSD で行い、 $p < 0.05$ を有意差とした。

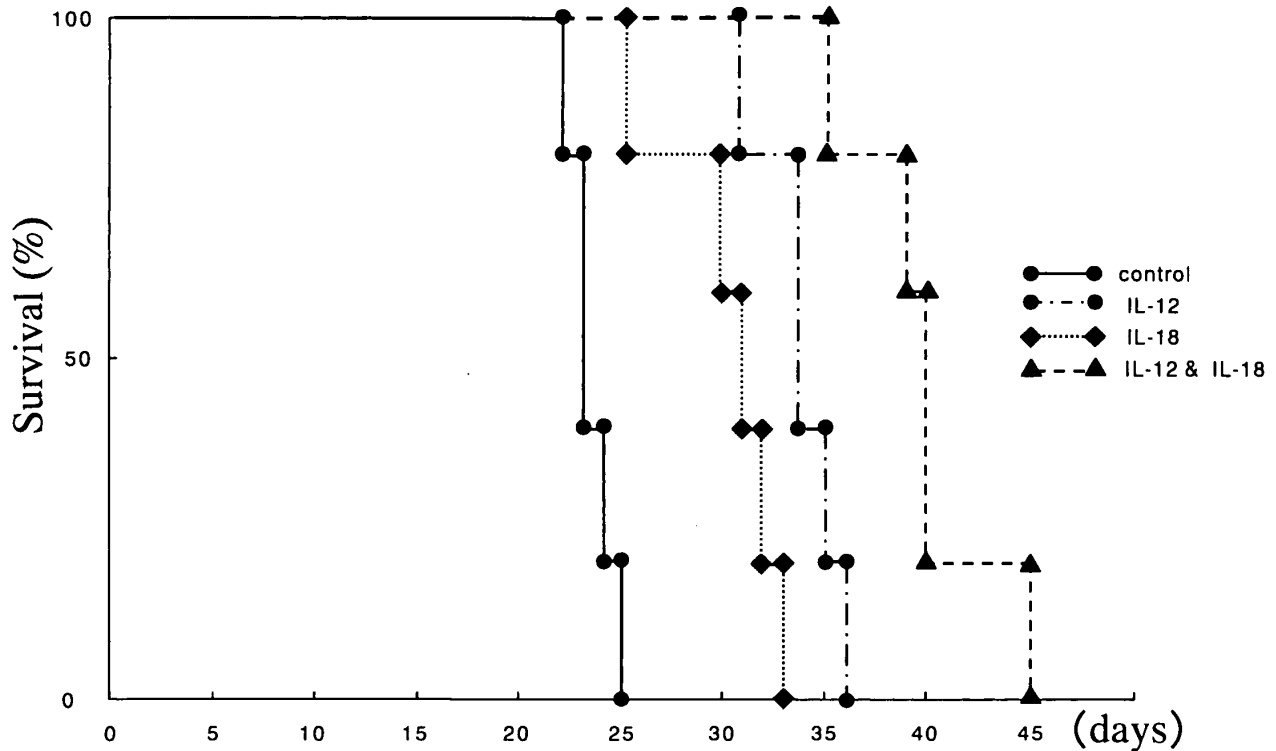


Fig. 4. This figure illustrates survival curves of three experimental groups and control.

Table 1. Survival days in the IL-12 and/or IL-18 administration

Treatment	Survival days ^a
IL-12 & IL-18	42.3±1.3 [#]
IL-12	34.5±2.0 [#]
IL-18	29.5±2.4 [#]
Control	23.5±1.3

^b
^{*}
^{**}

a: Mean ± S.D.

b: Significance was determined by Fisher's PLSD(* $p < 0.05$. ** $p < 0.01$).

#: Significant of difference from control ($p < 0.01$).

結 果

1. 自然経過における腫瘍増殖曲線 (Fig. 3)

1×10^6 個 / 0.1mlの腫瘍細胞を背部皮下に移植した。腫瘍は移植後ほぼ球状に増殖し、移植後7日目から触知が可能となった。7日目の腫瘍体積は $218.4 \pm 34.8 \text{ mm}^3$ 、16日目は $4,238.1 \pm 793.3 \text{ mm}^3$ 、22日目には $6,304.2 \pm 1,127.6 \text{ mm}^3$ となり、

25日目は全例が腫瘍死した。

2. IL投与群の腫瘍増殖曲線 (Fig. 3)

上記と同様に 1×10^6 個 / 0.1mlの腫瘍細胞を背部皮下に移植した。腫瘍移植後16日目の平均腫瘍体積は、IL-12投与群は $1,283.9 \pm 244.5 \text{ mm}^3$ 、IL-18投与群は $1,748.4 \pm 493.1 \text{ mm}^3$ 、併用投与群は $342.5 \pm 149.8 \text{ mm}^3$ であった。腫瘍移植後22日目の平均腫瘍体積は、IL-12投与群は $1,890.0 \pm 284.3$

Table 2. Cytokine production by IL-12 and/or IL-18 administration

Treatment	IFN- γ ^b (pg/ml)	IL-4 ^b (pg/ml)
IL-12 & IL-18 ^a	2,467.4 \pm 542.6 ^{##d}	<15.6
IL-12 ^a	362.5 \pm 137.9 [#]	<15.6
IL-18 ^a	83.6 \pm 28.8 [#]	<15.6
Control ^a	<15.6	<15.6

a: Mouse sera for cytokine measurement were collected

24 hours after the third injections.

b: Values are the mean \pm S.D.

c: Significance was determined by Fisher's PLSD (* p < 0.05. ** p < 0.01).

d: Significant difference from control (# p < 0.05. ## p < 0.01).

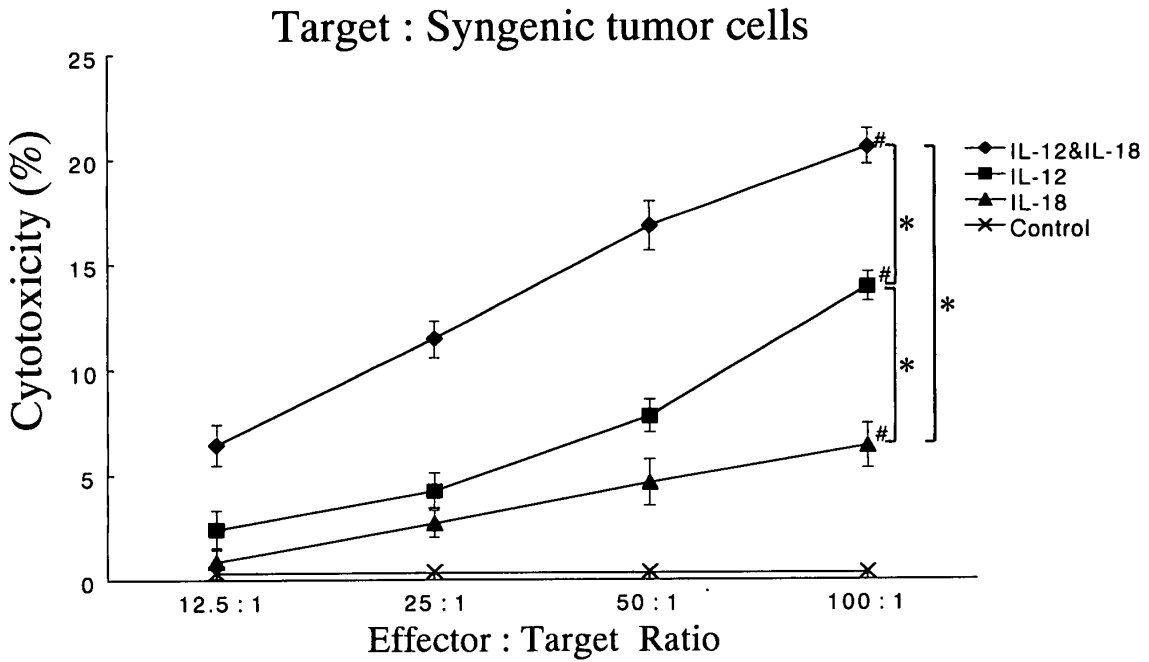


Fig. 5. Cytotoxicity activity of spleen cells on the 10 days after tumor cells inoculation (24hour after the third injections.) Spleen cells were tested for cytotoxicity against syngenic tumor cells as effector : target (E : T) ratio of 12.5 : 1, 25.0 : 1, 50.0 : 1, 100 : 1. Target cells were labeled by BrdU and incubated with effector cells for 6 hours. The significant of differences between each groups were determined by applying Fisher's PLSD (* p < 0.01.). Bars, SD.
: Significant difference from control (p < 0.01).

mm³, IL-18投与群は3,625.9 \pm 434.1mm³, 併用投与群は982.1 \pm 194.2mm³であった。腫瘍増殖抑制率は, IL-12投与群は70.0 \pm 10.5%, IL-18投与群は42.4 \pm 15.4%, 併用投与群では84.4 \pm 5.6%と最も高く, また各群間に有意差 (p < 0.01) を認めた。対照群と比較し腫瘍の増殖は緩慢であった

が, 最終的には全例とも腫瘍死した。

3. IL 投与群の平均生存日数(Fig. 4, Table 1)

IL-12投与群では34.5 \pm 2.0日, IL-18投与群は29.5 \pm 2.4日, 併用投与群では42.3 \pm 1.3日であり各群間で有意な延命効果 (p < 0.05) を認めた。また, 対照群は23.5 \pm 1.3日であり, IL 投与群と

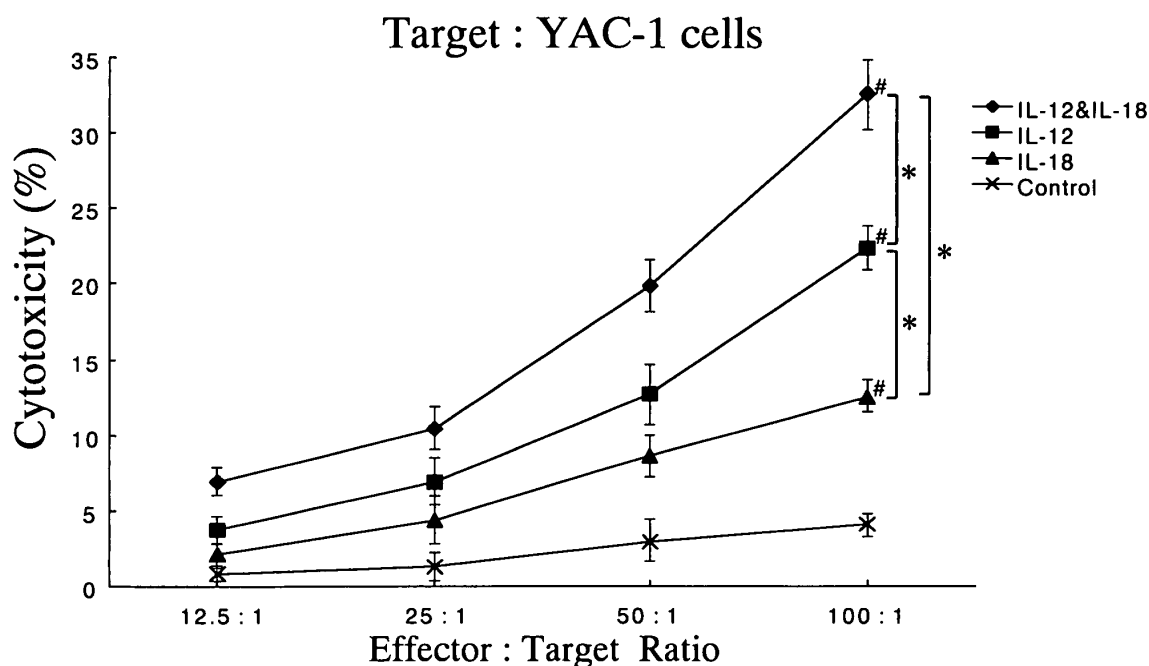


Fig. 6. NK activity on the 10 days after tumor cells inoculation (24hour after the third injections.) Spleen cells were tested for NK activity against YAC-1 cells as effector : target (E : T) ration of 12.5 : 1, 25.0 : 1, 50.0 : 1, 100 : 1. Target cells were labeled by BrdU and incubated with effector cells for 6 hours. The significant of differences between each groups were determined by applying Fisher's PLSD (* $p < 0.01$). Bars, SD.
: Significant difference from control ($p < 0.01$).

Table 3. Cytotoxicity (%)

Target cells	Treatment	E:T ratio			
		100 : 1	50.0 : 1	25.0 : 1	12.5 : 1
Syngenic tumor cells	IL-12&IL-18	20.6±0.9 ^a #	16.8±0.8 [#]	11.5±0.6 [#]	6.4±0.5 [#]
	IL-12	13.9±0.4 [#] *	7.8±0.3 [#] *	4.2±0.2 [#] *	2.4±0.3 [#] *
	IL-18	6.4±0.5 [#] *	4.6±0.2 [#] *	2.6±0.3 [#] *	0.9±0.3 [#] *
	Control	0	0	0	0
YAC-1 cells	IL-12&IL-18	32.6±4.1 [#]	19.1±1.5 [#] *	10.4±1.2 [#] *	6.9±0.6 [#] *
	IL-12	22.4±1.6 [#] *	12.7±1.1 [#] *	6.6±0.5 [#] *	3.7±0.4 [#] *
	IL-18	12.5±0.6 [#] *	8.6±1.1 [#] *	4.4±0.3 [#] *	2.1±0.3 [#] *
	Control	4.1±0.3	2.9±0.2	1.2±0.2	0.9±0.2

a : Mean ± S.D.

b : Significance was determined by Fisher's PLSD(* $p < 0.05$. ** $p < 0.01$).

#: Significant of difference from control ($p < 0.01$).

の間に有意差 ($p < 0.01$) を認めた。

4. 産生サイトカイン

各群マウスの血清中の IFN- γ , IL-4 濃度を ELISA 法にて測定した結果を Table 2 に示す。

血清中の IFN- γ 濃度は, IL-12投与群では

362.5±137.9pg/ml, IL-18投与群では83.6±28.8 pg/ml, 併用投与群では2,467.4±542.6pg/mlと増加が認められ, 各群間に有意差 ($p < 0.05$) を認めた。対照群は検出限界の15.6pg/ml以下であり, IL 群との間に有意差 ($p < 0.05$) を認めた。

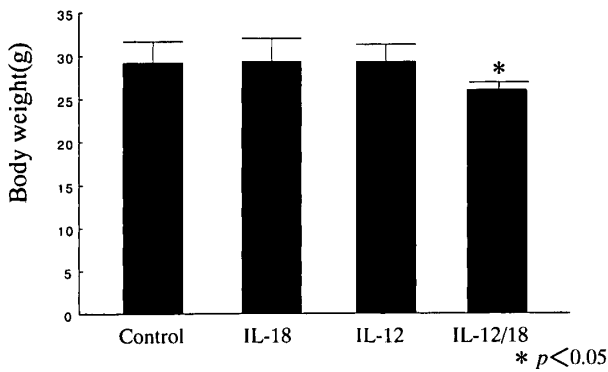


Fig. 7. Body weight of mice at killing. Each bar represents the mean \pm standard deviation. The significant of differences between the groups were determined by applying Fisher's PLSD (* $p < 0.05$).

IL-4の血清中の濃度は各群とも検出限界の15.6pg/ml以下であった。

5. 細胞傷害活性

各群マウス脾細胞の腫瘍細胞に対する細胞傷害活性およびNK細胞感受性YAC-1細胞に対する細胞傷害活性(NK活性)をFig. 5, Table 3に示す。

腫瘍細胞に対する脾細胞の細胞傷害活性は、IL投与群ではE/T比が100:1のときにいずれも最大値を示した。そのうち併用投与群は $20.6 \pm 0.9\%$ で最も高く、次いでIL-12投与群の $13.9 \pm 0.4\%$ 、IL-18投与群の $6.4 \pm 0.5\%$ の順であり、各群間に有意差($p < 0.01$)を認めた。対照群では細胞傷害活性は認められなかった。

YAC-1細胞に対する脾細胞の細胞傷害活性は、IL投与群ではE/T比が100:1のときにいずれも最大値を示した。そのうち併用投与群が最も高く $32.6 \pm 4.1\%$ 、次いでIL-12投与群の $22.4 \pm 1.6\%$ 、IL-18投与群の $12.5 \pm 0.6\%$ の順であり、各群間に有意差($p < 0.01$)が認められた。また、対照群ではE/T比が100:1のとき $4.1 \pm 0.3\%$ と軽度に上昇したが、IL投与群との間には有意差($p < 0.01$)が認められた。

6. 体重に対する影響

IL-12, IL-18の全身毒性の指標として、各群の屠殺時の体重を計測した結果をFig. 7に示した。IL-12投与群, IL-18投与群, 対照群の3群間には有意差が認められなかったが、併用投与

群では各群と比較し体重が約90%と有意な減少($p < 0.05$)を認めた。

考 察

生体の癌に対する防御機構の研究は、Burnetの免疫監視機構の概念提唱¹⁶⁾に始まり、1970年代にはBCGをはじめとする細菌製剤や非特異的免疫物質による腫瘍の治療研究が開始された。これまで、IL-2やIFN- γ を用いて悪性腫瘍に対するサイトカイン療法が試みられてきたが、いずれも満足な抗腫瘍効果への誘導には至らなかった¹⁷⁾。IL-12とIL-18は、抗原提示細胞上の腫瘍抗原に対する応答性が減弱したT細胞の免疫抑制を解除し、応答性を回復させることが可能なサイトカインである点^{18,19)}で、他のサイトカインと大きく異なっている。

本研究ではIL-12, IL-18を単独または併用で投与し、マウス扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果について検討した。

1. 腫瘍増殖および生存日数

IL-12, IL-18の単独または併用投与は有意に腫瘍増殖を抑制した。特に併用投与群は腫瘍増殖を最も強く抑制し、またIFN- γ の産生がIL-12, IL-18投与群と比較して約7~30倍の高値であった。本研究で使用したWHT/Htマウスの非担癌状態における脾細胞のリンパ球subsetはT細胞が37%を占めている²⁰⁾。併用投与群におけるIFN- γ 産生の顕著な増加はIL-12がこれらのT細胞を刺激することで、細胞上にIL-18 receptorが発現し、T細胞の活性化が増強されることによる相乗効果と考えられた¹⁹⁾。

抗腫瘍効果と関連して、生存期間は対照群と比較し各群とも延長が認められた。しかし、腫瘍が消失せずに全例腫瘍死したことはILの投与は腫瘍に対する直接効果でないことに加えて、腫瘍の再増殖による免疫応答の抑制、effector細胞の活性の低下などが考えられた。

2. 産生サイトカイン

血清中のIFN- γ , IL-4についてELISA法を用いて測定を行った。IL投与群ではIFN- γ

の血清中濃度は対照群と比較していずれも有意な増加を認め、特に併用投与群では顕著な増加が認められ、腫瘍増殖抑制率は84.4%と高く、生存日数も45日と対照群の約2倍の延命効果が認められた。

IFN- γ の腫瘍細胞に対する作用はIFN-inducible protein-10 (IP-10)誘導による血管新生阻害²¹⁾、腫瘍細胞へのiNOS発現誘導²²⁾など多数報告されているが^{23,24)}、腫瘍に対する宿主の免疫応答を誘導する²⁵⁾ことから、IFN- γ 産生の増強が細胞性免疫を優位の状態にシフトさせ、腫瘍細胞の排除に関わっていることが考えられた^{26,27)}。IL-4の血清中濃度が各群とも測定限界以下であったことから、このことが示唆された。

3. 細胞傷害活性

本研究では標的細胞をBrdUで標識しrelease assayを行った。細胞傷害活性の測定には⁵¹Cr標識によるrelease assay²⁸⁾が繁用されているが、本法はradio isotopeを使用する必要がないため、実験の場所を選ぶことなく容易に測定を行うことが可能である。また、実験手技も比較的容易であるという利点がある。測定感度は⁵¹Cr release assayと同程度であり、結果の相関が高い方法である¹³⁻¹⁵⁾。

IL投与群脾細胞は腫瘍細胞に対する細胞傷害活性が増強し、各群間に有意差を認め、IL-12、IL-18の投与がT細胞系を活性化したことが推察された。対照群では細胞傷害活性が認められなかったが、本研究で使用した腫瘍の腫瘍抗原が極めて低免疫原性であるため¹¹⁾と考えられた。

本研究で使用したYAC-1細胞はマウスリンパ腫由来の細胞株で、マウスNK細胞に高い感受性を有し¹²⁾、マウスNK活性を測定する際の標的細胞として広く用いられている。YAC-1細胞に対する細胞傷害活性(NK活性)の測定では、IL投与群ではいずれもNK活性は増強し、特に併用投与群では高い活性がみられた。NK活性の上昇はILの投与によりNK細胞が賦活化を示し²⁹⁾、IFN- γ 産生も誘導される⁴⁾こ

とから、抗腫瘍効果への広範な関与が考えられた。

対照群に軽度のNK活性が認められたが、これは腫瘍細胞の移植によるものと考えられた。

4. マウスの体重

全身に対する毒性の評価として、IL-12、IL-18投与24時間後の屠殺時のマウス体重を測定した。併用投与群の平均体重は他群の約90%と減少を認めた。しかし、腫瘍増殖の抑制、生存期間の延長が顕著に認められたことから、副作用としては軽微であったと考えられた。この原因がIFN- γ の過剰産生によるものであるか否かは現在解明されていない³⁰⁾。

IL-12、IL-18の併用投与はその相乗作用により極めて高いIFN- γ の産生を示し、抗腫瘍効果が高いことから癌免疫治療への今後の展望が期待されている。

結 論

近交系WHT/Htマウスに自然発生した可移植性扁平上皮癌に対するIL-12とIL-18の影響について検討した結果、以下の結論を得た。

1. IL-12、IL-18の投与は移植腫瘍の増殖を抑制し、有意な延命効果が認められた。また、その効果はIL-12とIL-18を併用投与することで増強した。
2. 血清中のIFN- γ 濃度はIL-12、IL-18投与により増強を認め、併用投与群では顕著に高値を示した。
3. マウス脾細胞の同系腫瘍細胞およびYAC-1細胞に対する細胞傷害活性は、IL-12、IL-18の投与により活性に増強が認められた。
4. IL-12とIL-18の併用投与は抗腫瘍効果が極めて高く、IFN- γ の産生と細胞傷害活性の増強が大きな役割を果たしていると考えられた。
5. 併用投与群では体重の減少がみられ、併用投与による毒性が示唆された。

謝 辞：稿を終えるにあたり、終始ご懇篤な指導、校閲を賜りました恩師関山三郎教授に

深甚なる謝意を捧げます。また、本研究の遂行に際しご助言を頂きました当講座杉山芳樹助教授に深く感謝致します。さらに、本研究の遂行にあたり懇切丁寧な実験手技のご指導を賜りました口腔生化学講座客本斉子講師に心から感謝の意を表します。最後に、様々な面にてご協力を頂きました口腔外科学第二講座医局員各位に深く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、2001年10月25日、第46回日本口腔外科学会総会において発表した。

参 考 文 献

- 1) Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G. : Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170 : 827-845, 1989
- 2) Gately, M. K., Desai, B. B., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., Dwyer, C. M., Podlaski, F. J., Familletti, P. C., Sinigaglia, F., Chizzonite, R., and Gubler, U. : Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J. Immunol.* 147 : 874-882, 1991
- 3) Okamura, H., Tsutsui, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., and Hattori, K. : Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature* 378 : 88-91, 1995
- 4) Tomura, M., Zhou, X. Y., Maruo, S., Ahn, H. J., Hamaoka, T., Okamura, H., Nakanishi, K., Tanimoto, T., Kurimoto, M., and Fujiwara, H. : A critical role for interleukin-18 in the proliferation and activation of NK1.1⁺CD3⁻ cells. *J. Immunol.* 160 : 4738-4746, 1998
- 5) Brunda, M. J., Luistro, L., Warriar, R. R., Wright, R., Hubbard, B. R., Murphy, M., Wolf, S. F., and Gately, M. K. : Antitumor and antimetastatic activity of interleukin-12 against murine tumors. *J. Exp. Med.* 178 : 1223-1230, 1993
- 6) Nasttala, C. L., Edington, H. D., McKinney, T. G., Tahara, H., Nalesnik, M. A., and Brunda, M. J. : Recombinant interleukin-12 induces tumor regression in association with IFN- γ production. *J. Immunol.* 153 : 1697-1706, 1994
- 7) Mu, J., Zou, J. P., Yamamoto, N., Tsutsui, T., Tai, X. G., Kobayashi, M., Herrmann, S. H., and Hamaoka, T. : Administration of recombinant interleukin-12 prevents outgrowth of tumor cells metastasizing spontaneously to lung and lymph nodes. *Cancer Res.* 55 : 4404-4408, 1995
- 8) Micallef, M. J., Tanimoto, T., Kohno, K., Ikeda, M., and Kurimoto, M. : Interleukin 18 induces the sequential activation of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes to protect syngenic mice from transplantation with Meth A sarcoma. *Cancer Res.* 57 : 4557-4563, 1997
- 9) Ahn, H. J., Maruo, S., Tomura, M., Mu, J., Hamaoka, T., Nakanishi, K., Clark, S., Kurimoto, M., Okamura, H., and Fujiwara, H. : A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducing factor in enhanced production of IFN-gamma. *J. Immunol.* 159 : 2125-2531, 1997
- 10) Osaki, T., Peron, J. M., Cai, Q., Okamura, H., Robbins, P. D., Kurimoto, M., Lotze, M. T., and Tahara, H. : IFN-gamma-inducing factor/IL-18 administration mediates IFN-gamma and IL-12-independent antitumor effects. *J. Immunol.* 160 : 1742-9, 1998
- 11) Hewitt, H. B., and Skamoto, K. : The comparative survival of clonogenic cells of murine epithelioma after irradiation in mice breathing air, oxygen and carbon dioxide, or hyperbaric oxygen. *Brit. J. Radiol.* 44 : 457-463, 1971
- 12) Habu, S., Fukui, H., Shimamura, K., Kasai, M., Okumura, K., and Tamaoki, N. : Role of natural killer cells against tumor growth in nude mice—a brief review. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 8 : 465-468, 1983
- 13) Huong, P. L., Kolk, A. H., Eggelte, T. A., Verstijnen, C. P., Gilis, H., and Hendriks, J. T. : Measurement of antigen specific lymphocyte proliferation using 5-bromo-deoxyuridine incorporation. An easy and low cost alternative to radioactive thymidine incorporation. *J. Immunol. Meth.* 140 : 243-248, 1991
- 14) Callewaert, D. M., Lightbody, J. J., Kaplan, J., Jaroszewski, J., Peterson, W. D., and Rosenberg, J. C. : Cytotoxicity of human peripheral lymphocytes in cell-mediated lympholysis ; antibody-dependent cell-mediated lympholysis and natural cytotoxicity assays after mixed lymphocyte culture. *J. Immunol.* 121 : 81-85, 1978
- 15) Ackermann, M. F., Lamm, K. R., Wiegand, G. W. and Luster M. I. : Antitumor activity of murine neutrophils demonstrated by cytometric analysis. *Cancer Res.* 49 : 528-32, 1989
- 16) Burnet, M. : Immunological factors in the process of carcinogenesis. *Brit. Med. Bull.* 20 : 154-158, 1964
- 17) Dullens, H. F., and Dewit, C. L. : Cancer treatment with interleukins 1, 4 and 6 and combinations of cytokines : a review. *In Vivo.* 5 : 567-

- 570, 1991
- 18) Zou, J. P., Yamamoto, N., Fujii, T., Takenaka, H., Kobayashi, M., Herrmann, S. H., Wolf, S. F., Fujiwara, H., and Hamaoka, T. : Systemic administration of rIL-12 induces complete tumor regression and protective immunity : response is correlated with a striking reversal of suppressed IFN-gamma production by anti-tumor T cells. *Int. Immunology*. 7 : 1135-45, 1995
- 19) Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S., and Nakanishi, K. : IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th 1 cells, and B cells : synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J. Immunol*. 161 : 3400-3407, 1998
- 20) 高橋 衛 : マウス自然発生癌の腫瘍内浸潤リンパ球に関する研究, 岩医大歯誌, 17 : 16-32, 1992
- 21) Zou, J. P., Yamamoto, N., Fujii, T., Takenaka, H., Kobayashi, M., Herrmann, S. H., Wolf, S. F., Fujiwara, H., and Hamaoka, T. : Systemic administration of rIL-12 induces complete tumor regression and protective immunity : response is correlated with a striking reversal of suppressed IFN-gamma production by anti-tumor T cells. *Int. Immunology*. 7 : 1135-45, 1995
- 22) Yu, W. G., Yamamoto, N., Takenaka, H., Mu, J., Tai, X. G., Zou, J. P., Ogawa, M., Tsutsui, T., Wijesuriya, R., Yoshida, R., Herrmann, S., Fujiwara, H., and Hamaoka, T. : Molecular mechanisms underlying IFN-gamma-mediated tumor growth inhibition induced during tumor immunotherapy with rIL-12. *Int. Immunol*. 8 : 855-865, 1996
- 23) Yamamoto, N., Zou, J. P., Li, X. F., Takenaka, H., Noda, S., Fujii T., Ono, S., Kobayashi, Y., Mukaida, N., and Matsushima, K. : Regulatory mechanisms for production of IFN-gamma and TNF by antitumor T cells or macrophages in the tumor-bearing state. *J. Immunol*. 154 : 2281-2290, 1995
- 24) Sugarman, B. J., Aggarwal, B. B., Hass, P. E., Figari, I. S., Palladino, M. A., and Shepard, H. M. : Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230 : 943-945, 1985
- 25) Takeda, K., Seki, S., Ogasawara, K., Anzai, R., Hashimoto, W., Sugiura, K., Takahashi, M., Satoh, M., and Kumagai, K. : Liver NK1.1+CD 4 +alpha beta T cells activated by IL-12 as a major effector in inhibition of experimental tumor metastasis. *J. Immunol*. 156 : 3366-73, 1996
- 26) Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, MG., Piccinini, M.P., Maggi, E., Trinchieri, G., and Romagnani, S. : Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th 1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med*. 177 : 1199-1204, 1993
- 27) Otani, T., Nakamura, S., Toki, M., Motoda, R., Kurimoto, M., and Orita, K. : Identification of IFN-gamma-producing cells in IL-12/IL-18-treated mice. *Cellular Immunol*. 198 : 111-119, 1999
- 28) 菊池浩吉 : ⁵¹Cr 標識細胞障害試験, 日本免疫学会編 : 免疫実験操作IV 第一版, 前田印刷, 金沢, 349-351, 1972
- 29) Osaki, T., Person, J. M., and Cai, Q. : IFN- γ -inducing factor/IL-18 administration mediates IFN- γ and IL-12 independent antitumor effects. *J. Immunol*. 160 : 1742-1749, 1996
- 30) Nakamura, S., Otani, T., Ijiri, Y., Motoda, R., Kurimoto, M., and Orita, K. : IFN-gamma-dependent and -independent mechanisms in adverse effects caused by concomitant administration of IL-18 and IL-12. *J. Immunol*. 164 : 3330-3336, 2000