

## 絨毛癌細胞株の腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor) に対する抵抗性の解析

大阪大学医学部産科婦人科学教室

亀田 隆 根来 孝夫 鮫島 義弘 高橋 俊一  
古山 将康 松崎 昇 佐治 文隆 谷澤 修

### Low Sensitivity of Choriocarcinoma Cell Lines to Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$

Takashi KAMEDA, Takao NEGORO, Yoshihiro SAMEJIMA,  
Shunichi TAKAHASHI, Masayasu KOYAMA, Noboru MATSUZAKI,  
Fumitaka SAJI and Osamu TANIZAWA

*Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka University Medical School, Osaka*

**概要** 絨毛癌細胞株である GCH-1, BeWo, JEG-3 に対する tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  の抗腫瘍効果について,  $^3\text{H}$ -thymidine 取り込み試験および tetrazolium salt (MTT) 色素取り込み試験を用いて検討を行い, 以下の結果を得た。

1) 3種の絨毛癌細胞株は, TNF- $\alpha$  1,000u/ml, 24時間処理に対し, 強い抵抗性を認め,  $^3\text{H}$ -thymidine 試験の%responseは78%以上, MTT試験のdye uptakeにおいても81%以上と高値を示した。一方, 膵癌由来のPanc-1, 大腸癌由来のLovoおよび子宮内膜癌由来のIshikawaなど絨毛癌細胞株以外の腫瘍細胞株は, いずれもTNF- $\alpha$ に対し感受性を認め, その添加により $^3\text{H}$ -thymidine試験の%responseは $29 \pm 4.6\%$ , MTT試験においてもdye uptakeは平均 $53 \pm 19\%$ と低値を示した。

2) TNF- $\alpha$  1,000u/mlとその作用増強因子であるinterferon (IFN)- $\gamma$  100u/mlを併用し, その抗腫瘍効果について検討を行った。その結果, 絨毛癌以外の腫瘍細胞株では, TNF- $\alpha$ の作用はIFN- $\gamma$ によつて増強し,  $^3\text{H}$ -thymidine試験の%responseは $15 \pm 5.4\%$ , MTT試験のdye uptakeは $39 \pm 9\%$ とさらに低下した。一方, 絨毛癌細胞株ではTNF- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ の併用によつても, 抗腫瘍効果は認められず,  $^3\text{H}$ -thymidine試験においても%responseは83%以上, MTT試験においてもdye uptakeは98%以上であった。

3) 次に, TNF- $\alpha$ またはIFN- $\gamma$ の単独もしくは併用により, 腫瘍細胞表面の主要組織適合抗原(MHC) class Iが変化するかどうかを,  $^{125}\text{I}$ を用いたcellular binding radioimmunoassayによつて, 定量的に検討を行った。その結果, 絨毛癌細胞株以外の腫瘍細胞株では, TNF- $\alpha$ およびIFN- $\gamma$ の単独もしくは併用により, MHC class I抗原の増加が認められた。しかし絨毛癌細胞株では, 単独および併用によつても, 変化は認められなかった。

以上の事実は, 絨毛癌細胞株の宿主抵抗性の一因を示すと考えられた。

**Synopsis** Sensitivity of cultured choriocarcinoma cell lines to tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interferon (IFN)- $\gamma$  was examined and compared with that of other cultured tumor cell lines. Tumor cells were cultured with 1,000u/ml of TNF- $\alpha$  and/or 100u/ml of IFN- $\gamma$  for 24hr. Antitumor effects of the lymphokines were measured by  $^3\text{H}$ -thymidine uptake and tetrazolium salt (MTT) colorimetric assay. The results revealed that TNF- $\alpha$  and/or IFN- $\gamma$  had little anti-tumor effect on the choriocarcinoma cell lines tested, while they had cytostatic and cytotoxic effects on other cultured tumor cell lines including Panc-1 (pancreatic carcinoma cell line), Lovo (colon carcinoma cell line) and Ishikawa (uterine endometrial carcinoma cell line). We also examined the effect of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  on the expression of major histocompatibility complex (MHC) class I antigens in these tumor cell lines by means of cellular binding radioimmunoassay. No enhancing effect was observed on choriocarcinoma cell lines after the treatment with TNF- $\alpha$  and/or IFN- $\gamma$ . These results suggested the existence of a unique property of choriocarcinoma cells which results in the resistance to host immune attacks.

**Key words:** Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  · Interferon (IFN)- $\gamma$  · Choriocarcinoma cell line · Major histocompatibility complex (MHC)

## 緒 言

TNF- $\alpha$  は、腫瘍細胞および腫瘍細胞株に対して、抗腫瘍効果を有する cytokine の一つである<sup>19)</sup>。体内で発生する異物である腫瘍細胞に対して、免疫応答が生じ、これを排除する免疫監視機構の一つとして、TNF- $\alpha$  も産生分泌されると考えられている<sup>1)</sup>。TNF- $\alpha$  の抗腫瘍効果として、癌細胞に対して直接増殖抑制や破壊作用を示すだけでなく、間接的に宿主の免疫系を介したのも認められている<sup>13)14)</sup>。また TNF- $\alpha$  は、IFN- $\gamma$  の併用によつて直接、抗腫瘍効果を増強させることが知られている<sup>7)18)21)</sup>。さらに、TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  は、MHC class I 抗原の発現を増強することでも知られている<sup>8)15)</sup>。このように、TNF- $\alpha$  は単独で直接的または間接的に、その抗腫瘍効果をもつだけでなく、IFN- $\gamma$  との併用により、その抗腫瘍効果を高め、宿主の腫瘍特異的免疫応答能を高めていると考えられている。

絨毛癌細胞株は、MHC class I 抗原の発現に乏しいのみならず、非特異的な細胞障害作用を有する natural killer (NK) および lymphokine activated killer (LAK) 活性に対しても、著しい抵抗性をもつ特殊な腫瘍系である<sup>3)</sup>。

われわれは、絨毛癌細胞株に対する TNF- $\alpha$  の抗腫瘍効果、IFN- $\gamma$  との併用効果、およびその細胞表面上の MHC class I 抗原の変化について、検討を行った。

## 実験材料と方法

### 1. 培養腫瘍細胞株

TNF- $\alpha$  による抗腫瘍効果を検討するために、7種の腫瘍細胞株を用いた。絨毛癌細胞株としては、gestational choriocarcinoma 由来の GCH-1, BeWo, JEG-3を用い、それ以外の腫瘍細胞株としては、膵癌由来の Panc-1, 大腸癌由来の Lovo, 子宮内膜癌由来の Ishikawa, 白血病由来の K562を用いた。K562以外の6種の腫瘍細胞株は、すべて付着細胞である。このため、あらかじめ0.25% trypsin および0.02%EDTAにて37°C, 10分間処理し回収した後、2%仔牛血清 (FCS) 含有

RPMI1640で2回洗浄を行い、引き続いて行う実験に供した。

### 2. TNF- $\alpha$ と IFN- $\gamma$

TNF- $\alpha$  は、ヒト recombinant TNF- $\alpha$  (PT-050, 大日本製薬, 大阪) を種々の濃度で用いた。IFN- $\gamma$  は、ヒト recombinant IFN- $\gamma$  (武田製薬, 大阪)を用い、TNF- $\alpha$  との相乗効果の認められる100u/mlの濃度で用いた<sup>15)18)19)21)</sup>。

### 3. <sup>3</sup>H-thymidine 試験

一般に lymphotoxin の抗腫瘍効果は、cytostatic effect および cytotoxic effect によつて判定される<sup>4)21)</sup>。cytostatic effect とは、通常の培養条件において、lymphotoxin を添加したときの抗腫瘍効果を示し、cytotoxic effect とは、細胞増殖を停止させた条件で、lymphotoxin を添加した時の殺細胞効果を示す。<sup>3</sup>H-thymidine 試験では、cytostatic effect について検討を行った。target cell を96well 平底 microplate (CORNING 25860)に、 $5 \times 10^3$  cells/well で分注し、37°C, 5% CO<sub>2</sub>で24時間培養した。培養後 TNF- $\alpha$  または IFN- $\gamma$  を添加し、同時に<sup>3</sup>H-thymidine(0.25 $\mu$ Ci/well)で pulse を行い、引き続き24時間培養を行った。細胞を剥離させるため、0.2%EDTA 50 $\mu$ l を添加し室温で20分間処理した後、multiple automated sample harvester にて細胞を回収し、液体 scintillation counter にて計測を行った。結果は%response で表し、次の式によつて算出した。

$$\% \text{response} = \frac{\text{sample cpm} - \text{spontaneous cpm}}{\text{maximal cpm} - \text{spontaneous cpm}} \times 100$$

実験は triplicate で行い、その standard deviation (SD) は平均値の25%以内であつた。spontaneous cpm は maximal cpm の12%以内であつた。maximal cpm は TNF- $\alpha$  などを添加しない時の<sup>3</sup>H-thymidine uptake を示す。

### 4. MTT 試験

MTT 試験は、lymphotoxin の抗腫瘍効果判定にしばしば用いられ、cytostatic および cytotoxic effect のいずれもが、容易に判定可能である<sup>10)</sup>。

MTT 試験は、生細胞が tetrazolium salt (MTT) 色素を取り込むことを利用した検査である。cytostatic effect の判定は、 $^3\text{H}$ -thymidine と同様の手順で行った。target cell を 96well 平底 microplate (CORNING 25860) に分注し、24時間培養を行った。培養後、TNF- $\alpha$  または IFN- $\gamma$  または両者を添加し、さらに24時間培養を行い、assay を行う4時間前に MTT solution 10 $\mu\text{l}$  を添加した。MTT solution は、tetrazolium salt, 3 (4,5-dimethyl-thiazoyl-2-yl) 2,5diphenyltetrazolium bromide (MTT) (和光純薬, 大阪) を PBS にて溶解し、10mg/ml とした後遮光した試験管に準備したものを用いた。培養終了後、上清を除去し 0.04 N の HCl を含む isopropyl alcohol 100 $\mu\text{l}$  および 3% w/v sodium dodecyl sulfate 20 $\mu\text{l}$  を添加し、細胞を溶解させ、次いで ELISA reader (MTP-22, CORONA electric, 東京) を用いて、570nm の吸光度で測定を行った。また cytotoxic effect は、target cell を 96well microplate に分注する際、mitomycin C を 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で添加し、同時に TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  も添加、さらに24時間培養を行い、同様の手順にて assay を行った。結果は %dye uptake で表し、次の式に従った。

%dye uptake =

$$\frac{\text{sample OD} - \text{spontaneous OD}}{\text{maximal OD} - \text{spontaneous OD}} \times 100$$

実験はいずれも triplicate で行った。spontaneous OD は、細胞を分注しない培養液のみの well を色素で処理したもの。maximal OD は、TNF- $\alpha$  などを添加しないで色素処理したものを表す。spontaneous OD は、maximal OD の 12% 以内、SD は平均値の 18% 以内であった。cytotoxic effect において、mitomycin C 処理した腫瘍細胞株の  $^3\text{H}$ -thymidine uptake は、mitomycin C 処理しない腫瘍細胞株の 4% 以下であった。したがって、mitomycin C 処理により、いずれの腫瘍細胞株も十分な細胞増殖抑制が認められた。

#### 5. cellular binding radioimmunoassay

腫瘍株細胞表面上の MHC class I 抗原の検討に用いた。target cell は、10% FCS を含む RPMI1640 4ml に  $2 \times 10^6$  cell を採り small dish

(Falcon) に分注し、TNF- $\alpha$  1,000u/ml または IFN- $\gamma$  100u/ml を単独または同時添加または無添加で、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の条件で24時間培養を行った。培養後、付着細胞は 0.25% trypsin および 0.02% EDTA にて細胞剥離の後、cellular binding radioimmunoassay に供した。assay は、target cell  $5 \times 10^5$  cells/50 $\mu\text{l}$  を小試験管 (CORNING) に分注し、MHC class I 抗原に対する mouse monoclonal antibody (IOT2, コスモバイオ, 東京) 20 $\mu\text{l}$  を添加し、室温にて30分間ゆつくり振盪させながら反応させた。2% FCS 0.02%  $\text{NaN}_3$  を含む PBS にて2回洗浄し、次に  $^{125}\text{I}$  anti-mouse IgG ( $\text{ab}'_2$ ) (Amersham, Japan) を 20 $\mu\text{l}$  (200,000cpm) を添加し、室温で30分間反応させた。洗浄の後  $\gamma$ -counter にて計測を行った。実験はいずれも triplicate で行い、その SD は平均値の 8% 以内であった。

## 結 果

### 1. $^3\text{H}$ -thymidine 試験

Panc-1 および GCH-1 に対する、種々の濃度の TNF- $\alpha$  の cytostatic effect について、 $^3\text{H}$ -thymidine uptake の変化で検討を行った (図1)。Panc-1 に TNF- $\alpha$  を単独で添加した場合、濃度依存性に  $^3\text{H}$ -thymidine uptake は減少し、非添加時に 18,212cpm であった値が、100u/ml 添加でその 75% の 13,736cpm、1,000u/ml 添加でその 30% の 5,595cpm と減少した。また TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  との併用により、 $^3\text{H}$ -thymidine uptake はさらに減

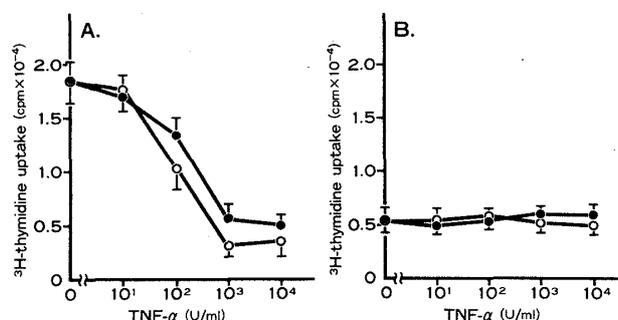


図1  $^3\text{H}$ -thymidine 取り込み試験。TNF- $\alpha$  の濃度を変化させた場合の  $^3\text{H}$ -thymidine uptake の変化 (cytostatic effect)。

●: TNF- $\alpha$  単独処理, ○: TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  (100 u/ml) 併用処理, A: Panc-1, B: GCH-1.

少し,  $TNF-\alpha$  100u/ml 添加で非添加時の55%の10,137cpm, 1,000u/ml 添加で17%の3,045cpmに減少した。したがって,  $TNF-\alpha$  は Panc-1に強い cytostatic effect を発揮し, その効果は  $IFN-\gamma$  によつて増強された。一方, 絨毛癌細胞株である GCH-1は,  $TNF-\alpha$  の濃度を増加した場合も, また  $TNF-\alpha$  と  $IFN-\gamma$  とを併用した場合も, その $^3H$ -thymidine uptake に変化を認めず, 非添加時に5,659cpm であつた値が,  $TNF-\alpha$  1,000u/ml 単独で6,763cpm,  $TNF-\alpha$  1,000u/ml と  $IFN-\gamma$  の併用でも5,212cpm と変化を認めなかつた。したがつて, GCH-1は  $TNF-\alpha$  の cytostatic effect に対して, 抵抗性を有することが示された。

次に, 3種の絨毛癌細胞株と3種のそれ以外の腫瘍株で,  $TNF-\alpha$  の最終添加濃度1,000u/ml,  $IFN-\gamma$ のそれを100u/mlで処理を行つた場合の $^3H$ -thymidine uptakeについて検討を行つた(図2)。その結果, Panc-1, Lovo, Ishikawa は  $TNF-\alpha$  に対し感受性を有し, その添加によつて $^3H$ -thymidine uptake は平均 $29 \pm 4.6\%$ と減少し, また  $TNF-\alpha$  と  $IFN-\gamma$  との併用によつて, 平均 $22 \pm$

11%とさらに減少した。一方, 絨毛癌細胞株である GCH-1, BeWo, JEG-3は  $TNF-\alpha$  単独で78%以上,  $TNF-\alpha$  と  $IFN-\gamma$  との併用によつても, 83%以上と高い値を示し,  $TNF-\alpha$  に対し強い抵抗性を有することが示された。また, 6種の腫瘍細胞株はいずれも,  $IFN-\gamma$  単独添加の場合,  $^3H$ -thymidine uptake に変化を認めなかつた。

## 2. MTT 試験

MTT 試験では, 3種の絨毛癌細胞株と3種のそれ以外の腫瘍株に対する cytostatic effect および cytotoxic effect について,  $TNF-\alpha$  の最終添加濃度1,000u/ml,  $IFN-\gamma$  のそれを100u/ml で検討を行つた。cytostatic effect を検討した結果(図3), Panc-1, Lovo, Ishikawa では  $TNF-\alpha$  の添加により, MTT dye uptake が平均 $53 \pm 19\%$ と減少し,  $TNF-\alpha$  と  $IFN-\gamma$  との併用により平均 $39 \pm 9\%$ と, さらに dye uptake の減少が認められた。一方, GCH-1, BeWo, JEG-3の3種の絨毛癌細胞株では, MTT dye uptake は,  $TNF-\alpha$  単独で81%以上また  $TNF-\alpha$  と  $IFN-\gamma$  併用によつても98%以上であり,  $TNF-\alpha$  の cytostatic effect は認められなかつた。次に cytotoxic effect の検討を行

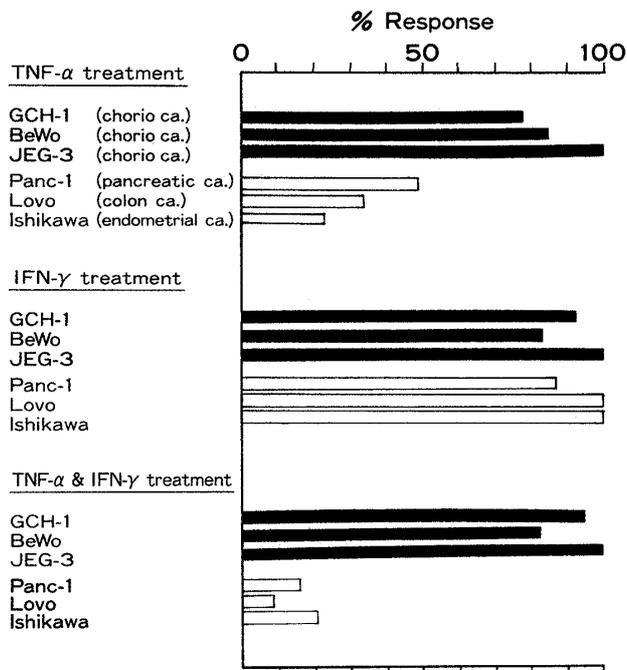


図2  $^3H$ -thymidine 取り込み試験.  $TNF-\alpha$  (1,000u/ml) and/or  $IFN-\gamma$  (100u/ml) 処理による6種の腫瘍細胞株の $^3H$ -thymidine uptake の変化 (cytostatic effect).

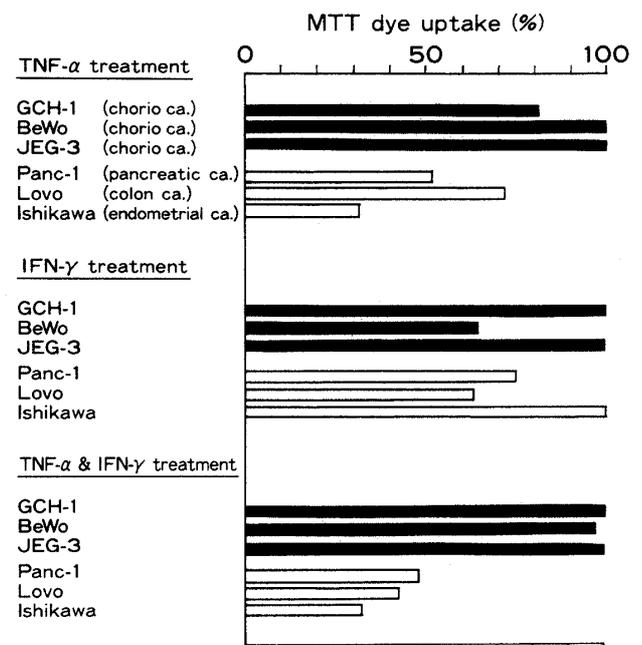


図3 MTT 色素取り込み試験.  $TNF-\alpha$  (1,000u/ml) and/or  $IFN-\gamma$  (100u/ml) による6種の腫瘍細胞株の MTT dye uptake の変化 (cytostatic effect).

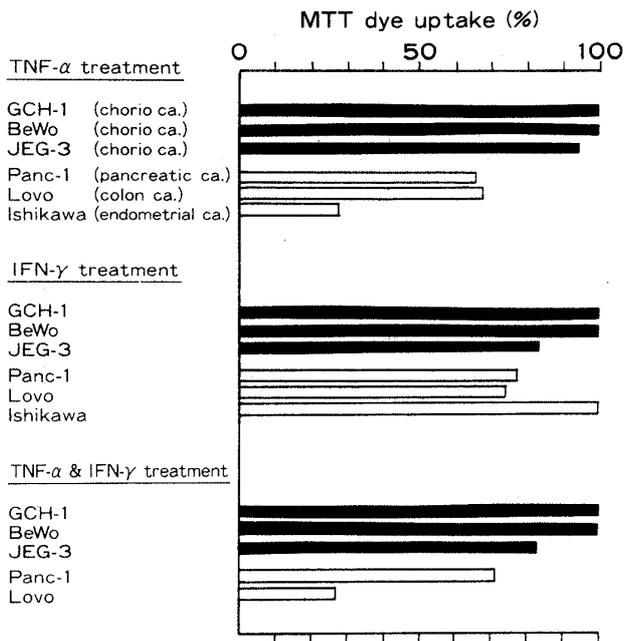


図4 mitomycin C (5 $\mu$ g/ml) 処理による MTT 色素取り込み試験, mitomycin C 処理した 6 種の腫瘍細胞株の MTT dye uptake に対する TNF- $\alpha$  (1,000 u/ml) and/or IFN- $\gamma$  (100u/ml) の影響 (cytotoxic effect).

つた(図4)。その結果 cytostatic effect と同様のことが観察された。すなわち, Panc-1, Lovo, Ishikawa では TNF- $\alpha$  や TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  との併用により MTT dye uptake の減少が認められたが, GCH-1, BeWo, JEG-3 では MTT dye uptake の減少は認められなかつた。以上のことより, MTT 試験では Panc-1, Lovo, Ishikawa に対して TNF- $\alpha$  が, cytostatic effect および cytotoxic effect の, 二つの抗腫瘍効果を有することが示された。またその効果は, IFN- $\gamma$  によつて増強した。一方, 3 種の絨毛細胞株では, TNF- $\alpha$  の抗腫瘍効果に対する強い抵抗性が確認された。

### 3. cellular binding radioimmunoassay

TNF- $\alpha$  または IFN- $\gamma$  は多くの腫瘍および腫瘍細胞株において, MHC class I 抗原の発現を増強させることが知られている。各腫瘍細胞株において, TNF- $\alpha$  あるいは IFN- $\gamma$  作用時の MHC class I 抗原の発現を cellular binding radioimmunoassay で検討した(図5)。Panc-1 では非添加時 40,731cpm が, TNF- $\alpha$  で 52,521cpm または IFN- $\gamma$  の添加によつて 53,110cpm, またそれらの

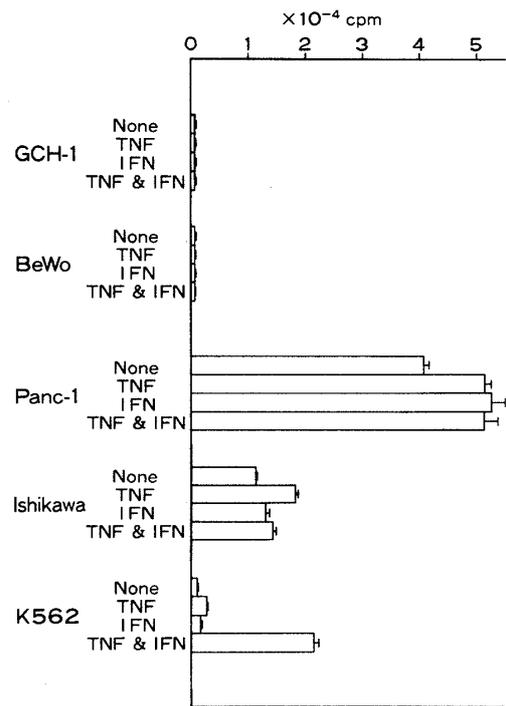


図5 TNF- $\alpha$  (1,000u/ml) and/or IFN- $\gamma$  (100u/ml) 処理による MHC class I 抗原の変化。

併用で 51,203cpm と, いずれも約 25% の発現増強を認めた。Ishikawa では非添加時 18,122cpm が, TNF- $\alpha$  添加で 25,143cpm と, 約 38% の発現増強が認められた。K562 は, MHC class I 抗原の発現にきわめて乏しいことで知られているが, 非添加時 882cpm, TNF- $\alpha$  の添加で 1,951cpm と発現量にほとんど変化なかつたが, TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  の同時添加により約 25 倍の 22,244cpm, と著明に発現増強が認められた。一方, GCH-1 と BeWo では MHC class I 抗原の発現は, K562 と同様にほとんど認められず 1,400cpm 以下であり, TNF- $\alpha$  単独または TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  の同時添加によつても, 1,880cpm 以下とその発現に大きな変化は認められなかつた。

### 考 察

TNF- $\alpha$  は, 正常細胞に対しては細胞障害作用を有しないが, 多くの腫瘍および腫瘍細胞株に対しては, 細胞障害作用を有する lymphotoxine である<sup>19)</sup>。われわれの検討した絨毛癌以外の腫瘍細胞株も, TNF- $\alpha$  に感受性を有し, TNF- $\alpha$  に対して cytostatic effect および cytotoxic effect が観

察された。一方、絨毛癌細胞株3種は、いずれもTNF- $\alpha$ に強い抵抗性を有し、抗腫瘍効果を受けないことが示された。絨毛癌細胞株は、他の腫瘍とは異なる性質を有する、きわめて特殊な腫瘍系であり、この性質は正常絨毛細胞に由来すると考えられている<sup>3)</sup>。絨毛癌細胞株が、種々の免疫反応に対する免疫抑制物質を分泌し、また正常絨毛細胞においても、同様の免疫抑制物質が分泌されていることは、その根拠の一つと考えられる<sup>5)16)</sup>。さらに、絨毛癌細胞株は他の腫瘍と異なり、NK cellやLAK cellなどの非特異的細胞障害作用に対しても、強い抵抗性を有するだけでなく<sup>3)</sup>、MHC抗原の欠如によつても、宿主の免疫監視機構から逃れている<sup>6)</sup>。われわれが示した、絨毛癌細胞株のTNF- $\alpha$ に対する抗腫瘍効果抵抗性も、宿主の免疫監視機構に対抗する性質の一つと考えられる。

TNF- $\alpha$ およびIFN- $\gamma$ は、MHC class I抗原の発現を増強させるcytokineでもある<sup>8)15)</sup>。このはたらきによつて、cytotoxic T lymphocyteの認識と産生を促して、局所において腫瘍に対する宿主の免疫応答能を高めていることが推測されている<sup>15)</sup>。われわれの実験においてもPanc-1やIshikawaは、TNF- $\alpha$ またはIFN- $\gamma$ により、MHC class I抗原の増強が認められた。しかし、絨毛癌細胞株であるGCH-1やBeWoは、いずれもMHC class I抗原を有さず、TNF- $\alpha$ やIFN- $\gamma$ による増強も認められなかつた。一方、K562は絨毛癌細胞株と同様に、TNF- $\alpha$ に対して抵抗性を有し、さらにMHC class I抗原を有さない腫瘍細胞株である<sup>17)</sup>。しかし、TNF- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ の同時添加により、MHC class I抗原の著明な発現増強が認められた。Pfizenmaier et al.はこれについて、他の同様の腫瘍細胞株の実験ともあわせて、腫瘍細胞のMHC抗原の発現は、宿主の腫瘍特異的免疫反応または腫瘍拒絶になくなくてはならない条件の一つであると報告している<sup>15)</sup>。以上のことから、絨毛癌細胞株はMHC class I抗原を発現せず、またlymphokineの刺激でも、その発現を惹起させにくい腫瘍と言える。したがつて、この性質も絨毛性腫瘍の宿主抵抗性の一因と考えられる。

TNF- $\alpha$ の抗腫瘍効果の機序として、TNF- $\alpha$ が

natural killer cytotoxic factor (NKCF) 類似物質である可能性が考えられている<sup>9)12)</sup>。一般に、NK cellはtarget cellの存在下にNKCFを分泌し、このNKCFがtarget cellの細胞障害作用を有する。われわれは、絨毛癌細胞株が、NK cellにきわめて強い抵抗性を有することを報告してきた<sup>3)</sup>。したがつて、TNF- $\alpha$ がNK cellの細胞障害物質と、同様の作用を有する物質と考えれば、NK cellに抵抗性を有する絨毛癌細胞株が、TNF- $\alpha$ に対しても抵抗性を有することは当然と思われる。

TNF- $\alpha$ の抗腫瘍効果のもう一つの機序として、TNF- $\alpha$ に対するreceptorの有無が、その作用発現に重要である<sup>11)</sup>。TNF receptorを有する細胞は、TNF- $\alpha$ に対し感受性を有し、そのreceptorの数に比例して、感受性が增大する。一方、TNF- $\alpha$ に対して抵抗性を有する腫瘍細胞、またはTNF- $\alpha$ に対して抵抗性を有すると考えられてきた正常細胞にも、receptorの存在が報告されている<sup>11)</sup>。さらに、アイソトープでlabelしたTNF- $\alpha$ を用いた実験によつて、TNF- $\alpha$ に感受性を有する細胞も、抵抗性を有する細胞も、TNF- $\alpha$ は同様に細胞内に取り込まれることがあきらかとなつた<sup>20)</sup>。TNF- $\alpha$ が、腫瘍細胞のみを選択的に障害する機序は、TNF- $\alpha$ がreceptorに結合した後の、正常細胞と腫瘍細胞の細胞内の生化学的機序の差異にあるとも考えられている<sup>2)</sup>。したがつて、絨毛癌細胞株がTNF- $\alpha$ に対するreceptorを欠如している場合、そのTNF- $\alpha$ に対する抵抗性の機序はあきらかであるが、receptorを有する場合は、その抵抗性を説明することは困難である。TNF- $\alpha$ に対するreceptorの検討は、今後の課題である。

#### 文 献

1. 笠倉新平：抗腫瘍免疫機構に働くサイトカイン。日臨免会誌，10：1，1987。
2. 加藤政明：ヒト腫瘍壊死因子(TNF)。代謝，23：217，1986。
3. 亀田 隆，根来孝夫，萩原正久，古山将康，松崎昇，佐治文隆，谷澤 修：絨毛癌細胞のlymphokine activated killer (LAK) 細胞に対する細胞障害抵抗性の解析。日産婦誌，41：1，1989。
4. 新津洋司郎，渡辺直樹，漆崎一郎：TNF, Biological Response Modifiers(螺良英郎，塚越 茂編)，

- 73, 医薬ジャーナル, 東京, 1987.
5. 松崎 昇: 絨毛癌より産生される免疫抑制物質の解析. 日産婦誌, 35: 481, 1983.
  6. 山下幸紀: 絨毛(癌)細胞の抗原性に関する研究. 第2章. 絨毛側からの検討. 19, 総北海出版, 旭川, 1985.
  7. Balkwill, F.R., Ward, B.G., Moodie, E. and Fiers, W.: Therapeutic potential of tumor necrosis- $\alpha$  and  $\gamma$ -interferon in experimental human ovarian cancer. *Cancer Research*, 47: 4755, 1987.
  8. Collins, T., Lapierre, L.A., Fiers, W., Strominger, J.L. and Pober, J.S.: Recombinant human tumor necrosis factor increases mRNA levels and surface expression of HLA-A,B antigens in vascular endothelial cells and dermal fibroblasts in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83: 446, 1986.
  9. Degliantoni, G., Murphy, M., Kobayashi, M., Francis, M.K., Perussia, B. and Trinchier, I. G.: Natural killer (NK) cell-driven hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor. *J. Exp. Med.*, 162: 1512, 1985.
  10. Green, L.M., Reade, J.L. and Ware, C.F.: Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods*, 70: 257, 1984.
  11. Kull, F.C. Jr., Jacob, S. and Cuatrecasas, P.: Cellular receptor for  $^{125}\text{I}$ -labeled tumor necrosis factor: Specific binding, affinity labeling, and relationship to sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 5756, 1985.
  12. Ortaldo, J.R., Mason, L.H., Mathieson, B.J., Liang, S., Flick, D.A. and Herberman, R.B.: Mediation of mouse natural cytotoxic activity by tumour necrosis factor. *Nature*, 321: 700, 1986.
  13.  $\phi$ stensen, M.E., Thiele, D.L. and Lipsky, P.E.: Tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J. Immunol.*, 138: 4185, 1987.
  14. Owen-Schaub, L.B., Gutterman, J.U. and Grimm, E.A.: Synergy of tumor necrosis factor and interleukin 2 in the activation of human cytotoxic lymphocytes: Effect of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 2 in the generation of human lymphokine-activated killer cell cytotoxicity. *Cancer Research*, 48: 788, 1988.
  15. Pfizenmaier, K., Scheurich, P., Schlüter, C. and Krönke, M.: Tumor necrosis factor enhances HLA-A,B,C and HLA-DR gene expression in human tumor cells. *J. Immunol.*, 138: 975, 1987.
  16. Saji, F., Koyama, M., Kameda, T., Negoro, T. and Tamizawa, O.: Effect of a soluble factor secreted from cultured human trophoblast cells on in vitro lymphocytes reactions. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 13: 121, 1987.
  17. Scheurich, P., Ücer, U., Krönke, M. and Pfizenmaier, K.: Quantification and characterization of high-affinity membrane receptors for tumor necrosis factor on human leukemic cell lines. *Int. J. Cancer*, 38: 127, 1986.
  18. Schiller, J.H., Bittner, G., Storer, B. and Willson, J.K.V.: Synergistic antitumor effects of tumor necrosis factor and  $\gamma$ -interferon on human colon carcinoma cell lines. *Cancer Research*, 47: 2809, 1987.
  19. Sugarman, B.J., Aggarwal, B.B., Hass, P.E., Figari, I.S., Palladino, M.A. Jr. and Shepard, H. M.: Recombinant human tumor necrosis factor- $\alpha$ : Effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science*, 22: 943, 1985.
  20. Tsujimoto, M., Yip, Y.K. and Vilcek, J.: Tumor necrosis factor: Specific binding and internalization in sensitive and resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 7626, 1985.
  21. Williamson, B.D., Carswell, E.A., Rubin, B.Y., Prendergast, J.S. and Old, L.J.: Human tumor necrosis factor produced by human B cell lines: Synergistic cytotoxic interaction with human interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 5397, 1983.

(No. 6540 平1・2・7受付)