頭頸部腫瘍患者における血清中の TNF 活性

鈴木 秀 明* 栗田 口 敏 一* 高 坂 知 節*

論文要旨

頭頸部腫瘍患者15例の血清中の TNF 活性をマウス線維芽細胞由来の樹立細胞株である L-M 細胞を使った bioassay により測定した。未処理の血清中には 5~80units/ml の hrTNF に相当する L-M 細胞傷害性が検出された。しかしながら、その活性の大部分は 56°C、30分間の熱処理によって消失した。一方、hrTNF では 56°C処理によって影響を受けなかった。さらに熱処理を加えた血清においてなお残存したわずかな傷害活性は抗 TNF うさぎ血清によって抑制されなかった。すなわち、これらの悪性腫瘍患者の血清中にはかなりの量の L-M 細胞傷害活性が認められたが、TNF は検出されなかったといえることができる。

Key words: 腫瘍壊死因子 (TNF), 頭頸部腫瘍 (head and neck cancer), L-M 細胞 (L-M cell), 熱非働化 (heat-inactivation)

1. 緒 言

TNF (tumor necrosis factor) は endotoxin によって血清中に誘導され、Meth A肉腫や他の移植腫瘍に壊死をもたらす物質として1975年 Carswell ら¹⁾により報告された。TNF は monocyte や macrophage によって産生され、in vitro, in vivo において種々の腫瘍細胞に対し傷害活性を持つが、正常細胞は傷害しないとされている。さらに免疫機構の中において多くの生物活性を有することが明らかになってきているが、近年ヒト recombinant TNF (hrTNF) が入手可能となり、われわれ臨床家にとってはその抗腫瘍作用が最も興味を持たれるところである。

さて、ヒトの monocyte や macrophage が薬物の刺激なしに TNF を産生しうることを示す報告はいくつかなされているが、しかしながら悪性腫瘍患者の血清中の TNF 活性についてはほとんど報告例がない。Interferon に関しては、血清中の活性が悪性腫瘍患者において上昇することが知られている^{2,4)}。こうした cytokine 類はもともと免疫機構の中で抗腫瘍作用に深くかかわっており、近年の癌免疫療法において重要な位置を占めている。われわれは今回、頭頸性腫瘍患者血清中の TNF 活性について検索したので報告する。

2. 対象と方法

1) 対象症例とサンプル処理

* 東北大学医学部耳鼻咽喉科

Hideaki SUZUKI, Toshiichi AWATAGUCHI and Tomonori TAKASAKA: TNF Activity in the Sera of Patients with Head and Neck Carcinoma.

Department of Otolaryngology, Tohoku University School of Medicine.

表 1

症例	年齢	性別	原発部位	組織型	TNM	病期
1	32	男	舌	scc	rT4N2M ₀	IV
2	49	男	中咽頭	scc	T3N2M ₀	IV
3	49	女	舌	scc	T1N0M ₀	I
4	54	男	喉 頭	scc	T1N0M ₀	I
5	58	男	喉 頭	scc	T1N0M ₀	I
6	59	男	喉 頭	scc	T1N0M ₀	I
7	59	男	耳下腺	mec	rT4N0M ₀	IV
8	60	男	上 顎	scc	T3N2M ₀	IV
9	61	女	下咽頭	scc	rT2N0M ₀	II
10	62	男	中咽頭	scc	T3N2M ₀	IV
11	63	男	喉 頭	scc	rT1N1M ₀	III
12	63	女	下咽頭	scc	T2N0M ₀	II
13	64	男	喉 頭	scc	T2N0M ₀	II
14	65	男	喉 頭	scc	T3N0M ₀	III
15	67	男	喉 頭	scc	T1N0M ₀	I

scc: squamous cell carcinoma

mec: mucoepidermoid carcinoma

r: recurrence

対象は当科における頭頸部悪性腫瘍患者15例で男性12例、女性3例である(表1)。年齢は32~67歳、原発部位は喉頭7例、舌2例、中咽頭2例、下咽頭2例、上顎と耳下腺がそれぞれ1例である。放射線照射や化学療法施行中の例は含んでいない。血液採取は、発熱などの炎症症状のないときに行い、1500×g、10分間遠心して得ら

図 1 患者血清中の L-M 細胞傷害活性

れた血清は assay まで -20°C にて保存した。

2) TNF assay

TNF 活性の測定は L-M 細胞を用いた bioassay に基づいた。L-M 細胞はマウスの線維芽細胞より樹立された L929 に由来する細胞株で、TNF 感受性がひじょうに高いとされている（東北大学歯学部口腔細菌学教室より供与）。Assay は Ruff ら⁵⁾が述べた方法に従った。すなわち、96穴プレート中に 5×10^4 /well ずつの L-M 細胞を播き翌日までにおいて monolayer に培養する。次に連続希釈した試料または hrTNF（大日本製薬製）を加える。

24 時間培養後、上清を捨て生細胞を 0.2% crystal violet で染色し、洗浄、乾燥、塩酸エタノールで抽出後、540nm における吸光度 (A_{540}) を測定した。さらに % cytotoxicity を次のように計算した。

% cytotoxicity

$$= 1 - (\text{試料の } A_{540} / \text{control の } A_{540})$$

さらに hrTNF を standard として使用したことにより、試料中の TNF 活性を定量的に算出することができた。

Medium は fetal calf serum 5% 添加の RPMI-1640 を使い、さらに TNF 感受性を高めるため actinomycin D を最終濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ となるように加えた。

3) 抗 TNF 抗体による抑制試験

患者血清はさらに抗 TNF うさぎ血清（大日本製薬社製）を加え、 37°C 2 時間の preincubation 後、上述と同様に TNF 活性を測定した。

3. 結 果

図 1 に示したように未処理の患者血清中には 5~80

2 頭頸部腫瘍患者における血清中の TNF 活性

図 2 hrTNF の活性に対する 56°C 処理の影響

図 3 抗 TNF うさぎ血清による抑制試験

(N. S.: not significant)

units/ml の hrTNF に相当する L-M 細胞傷害活性が認められた。しかしながらこの活性は 56°C 30 分間の熱処理によってその大部分が消失した。一方、hrTNF の活性は 56°C の処理では全く影響を受けなかった（図 2）。15 例のうち図 1 に星印で示した 3 例（表 1 の症例 1, 2, 13 に当たる）では熱処理を経てもなおわずかに活性が残った。しかしこれらの残存した活性は抗 TNF うさぎ血清によって抑制を受けなかった（図 3）。抗 TNF うさぎ血清は 250 units/ml の hrTNF を完全に抑制する量を用いた。以上より患者血清中には TNF は検出されなかったということができる。

4. 考 察

ヒト血清が L 細胞や Meth A 肉腫に対して傷害活性を持つことは既に Green ら⁶⁾によって報告されている。本実験で示した TNF 以外の物質で L-M 細胞傷害活性を持つものとしては、補体、免疫抑制蛋白、免疫グロブリンなどが考えられる。（なお lymphotoxin は 56°C で安定である⁷⁾から該当しない。）血清中に存在する細胞増殖阻害因子については他にもいくつかの報告がある。たとえば Mashima ら⁸⁾や宮崎ら⁹⁾は rabbit, rat の血清中に growth-inhibitory protein が存在すると報告した。また Green ら¹⁰⁾や Wanebo ら¹¹⁾はヒト血清が TNF とは異なる抗腫瘍因子を含み、これが α_2 -

globulin 分画に存在すると述べた。このような血清中の腫瘍増殖阻害因子は癌免疫療法に応用可能であると考えられる。増殖阻害因子の中では近年、TNF が大きく注目を集めているが、他にもいくつかの物質が存在すると考えられ、今後の検索が待たれるところである。

さて、ヒト末梢血中の単核球細胞は種々の刺激によって TNF を再生することが知られている。さらに初代培養されたヒト macrophage が無刺激で TNF を産生することも報告されている¹²⁾。また Aberka ら¹³⁾は悪性腫瘍患者末梢血中の単核球細胞は健常人のそれよりも多量の TNF を産生することを示した。さらに興味深いことに、macrophage や cytotoxic T-cell や natural killer cell などの細胞傷害活性が TNF もしくは lymphotoxin に類似した物質によって媒介されることが最近明らかになった¹⁴⁻¹⁷⁾。これらの報告はヒト、特に担癌状態にあるヒトが TNF を産生しうること示唆するものであるが、今回われわれが検索した限りでは頭頸部腫瘍患者の血清中には TNF 活性は検出できなかった。その理由として1つには TNF が細胞性免疫の mediator として局所に局限してのみ存在しているということが考えられる。また TNF は血漿中での半減期がかなり短いのかも知れない¹⁸⁾。さらに頭頸部腫瘍は一般に小さいものが多く、TNF が産生されたとしても微量なため検出されないということも考えられる。

われわれが最近行った実験によれば食道扁平上皮癌由来の樹立細胞株のいくつかは TNF 感受性を持っているが、既に示したように担癌状態にあっても産生される TNF の量は生体内では検出限界以下であり自発的な腫瘍の退縮を求めることは無理であろう。しかし免疫療法の重要な特長の1つは生体にもともと備わった免疫機構を利用することであり、TNF についても内因性の TNF 産生を増強する試みが OK-432 や IFN γ などの組合せによって最近行なわれ始めている^{19,20)}。これらの試みには今後さらに大きな期待が寄せられるであろう。

SUMMARY

Although some authors have suggested the possibility of spontaneous production of tumor necrosis factor (TNF) in human, there are only a few reports about serum TNF activity in cancer patients. In the present study, TNF activity in the sera of 15 patients suffering from head and neck carcinomas was measured by L assay using L-M cell derived from the murine tumorigenic fibroblast line.

Untreated sera possessed L-M cell cytotoxicity equivalent to 5~80 units/ml of human recombinant TNF (hrTNF), however, major part of the cytotoxicity was lost by heat-inactivation at 56°C

for 30min. Meanwhile, hrTNF was not inactivated at 56°C. Moreover, the residual activity of the heat-inactivated sera was not inhibited by anti-TNF rabbit serum.

In conclusion, the sera of the patients of head and neck cancer contained considerable level of L-M cell cytotoxic factor, but did not any detectable level of TNF.

参考文献

- 1) Carswell EA, Old LJ et al: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72 : 3666-3670, 1975.
- 2) Hahn T, Levin S: The interferon system in patients with malignant disease. *J Interferon Res* 2 : 97-102, 1982.
- 3) Sato M, Yoshida H et al: Interferon activity and its characterization in the sera of patients with head and neck cancer. *Cancer* 54 : 1239-1251, 1984.
- 4) Horn Y, Zeidman JL et al: Serum interferon as a biological marker in malignant tumors. *Oncology* 42 : 164-168, 1985.
- 5) Ruff MR, Gifford GE: Rabbit tumor necrosis factor: Mechanism of action. *Infect Immun* 31 : 380-385, 1981.
- 6) Green S, Chiasson MA et al: Evidence for the presence of an antitumor factor in serum of normal animals. *Cancer Letters* 6 : 235-240, 1979.
- 7) Stites DP, Stobo JD et al: *Basic & Clinical Immunology* (4th ed). Los Altos, California, Lange Medical Publications, p102, 1982.
- 8) Mashima K, Kimura T et al: Growth-inhibitory protein present in rabbit serum, which is more effective on tumorigenic rat liver epithelial cells than on non-tumorigenic ones: its species and mode of existence. *Biochem Biophys Res Commun* 148 : 1215-1222, 1987.
- 9) 宮崎香, 藤田剛 他: 増殖阻害因子の分子的多様性と生理活性—特に血清中の増殖阻害因子とラットの形質転換細胞 RSV-BRL が分泌する増殖阻害因子について—*Biotherapy* 2 : 285-291, 1988.
- 10) Green S, Kim SH et al: A protein fraction (NGH) from serum of normal humans which is cytotoxic for HeLa cells in culture. *Cancer Letters* 11 : 345-350, 1981.
- 11) Wanebo HJ, Green S et al: Antitumor effects of a normal human serum factor (normal human globulin fraction 1) on human cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* 72 : 545-556, 1984.
- 12) Matthews N: Production of anti-tumor cytotoxin by human monocytes. *Immunology* 44 : 135-142, 1981.
- 13) Aberka D, Fisher S et al: Cachectin/tumour-necrosis-factor production by cancer patients. *Lancet* 23 : 1190, 1985.
- 14) Bakouche O, Ichinose Y et al: Plasma membrane-associated tumor necrosis factor. A non-integral membrane protein possibly bound to its own receptor. *J Immunol* 140 : 1142-1147, 1988.
- 15) Urban JL, Shepard HM et al: Tumor necrosis factor: A potent effector molecule for tumor cell

- killing by activated macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 83 : 5233-5237, 1986.
- 16) Young JDE, Liu CC: Multiple mechanism of lymphocyte-mediated killing. Immunology Today 9 : 140-144, 1988.
- 17) Ortaldo JR, Mason LH et al: Mediation of mouse natural cytotoxic activity by tumor necrosis factor. Nature 321 : 700-702, 1986.
- 18) 石黒淳三, 土屋徳弘 他 : ヒト天然型 TNF (MHR-24) の生体内動態. Biotherapy 1 : 290-299, 1987.
- 19) Kato M, Kakehi R et al: Anti-tumor therapy by induction of endogeneous tumor necrosis factor. Lancet 2 : 270, 1985.
- 20) 大島治之, 柚源一郎 他 : 腫瘍壊死因子(TNF) : 内因性 TNF 産生の人癌への応用とその展望. Biotherapy 1 : 145-151, 1987.