頬粘膜扁平上皮癌由来細胞株によるインターロイキン-1様物質の産生

宮内 忍・諸山隆正・高田和彰

Production of Interleukin-1 like factor by human tumor cell line established from squamous cell carcinoma of the buccal mucosa

Shinobu MIYAUCHI・Takamasa MOROYAMA・Kazuaki TAKADA

Abstract: The new cell line (Nakata-1) was established from squamous cell carcinoma of the buccal mucosa. IL-1 activity was found in its culture supernatants by thymocyte proliferation assay and fibroblast proliferation assay.

This activity revealed the same behavior as that of human macrophage IL-1 in gel filtration chromatography. This activity, therefore, is thought to be attributed to the so-called "IL-1 like factor."

Key words: Interleukin-1, squamous cell carcinoma, cultured cell line

緒 言

近年、腫瘍細胞がトランスフォーミンググロースファクター¹⁻³⁾、癌由来血管新生因子⁴⁾、インスリン様成長因子^{5,6)}等の液性因子を産生するという多くの報告がみられる。一方、インターロイキン-1 (IL-1) は、マクロファージの産生する液性因子の1つであり、炎症反応・免疫反応において重要な役割を果しているが^{7,8)}、同様の物質が上皮細胞、線維芽細胞などの多くの正常細胞⁹⁻¹⁸⁾でも産生されることが示されている。しかし、悪性腫瘍細胞においては扁平上皮癌^{19,20)}、メラノーマ²¹⁾などの数例で報告されているのみである。腫瘍細胞が、抗腫瘍作用を持つ IL-1 を産生する可能性のあることは非常に興味あることである。

今回われわれは、ヒト頬粘膜扁平上皮癌由来細胞 (Nakata-1) の培養株化に成功し、その培養上清中の IL-1 活性について検索を行ったので報告する。

材料ならびに方法

1. 培養材料

患者は■歳の男性で昭和61年2月■日、右側頬粘膜部

広島大学歯学部口腔外科学第1教室

(主任：高田和彰教授)

The First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Hiroshima University, School of Dentistry (Chief: Prof. Kazuaki Takada)

受付日：昭和62年9月2日

の腫瘍形成を主訴に広島大学歯学部■■■■■を初診し、悪性腫瘍の疑いにより同日生検を行った。このとき採取した原発部腫瘍組織より無菌的に5mm角大の材料を採取し初代培養を行った。

2. 培養液

細胞株の樹立には、Dulbecco's Modified Eagle Medium と Ham F 12 Medium (日水製薬 K.K.) を等量混和し、ペニシリン (90 µg/ml)、重炭酸ナトリウム (1.4 mg/ml)、10%牛胎児血清 (FBS, M.A. Bioproduct, USA) を加えた培養液 (DME/F-12) を用いた。その他の培養は、DMEM にペニシリン、重炭酸ナトリウム、牛胎児血清を加えたものを、また、胸腺細胞、マクロファージの培養には、RPMI-1640 (日水製薬 K.K.) に同量のペニシリン、重炭酸ナトリウム、10%FBSを加えたものを用いた。

3. 培養方法

採取した腫瘍組織を直ちに眼科用ハサミにて1mm角以下に細切し、60mmプラスチックプレート (Falcon, USA) に植え込み、組織片培養法による培養を行った。培養はすべて95%空気、5% CO₂、37°C の条件下に TH-HER 型インキュベーター (平沢製作所) 中で静置培養を行った。

初代培養期間中の培養液の交換は、1週間に2回とし、3回目までの培養液には 2.0 µg/ml のファンギゾン (Flow Lab. USA) を添加した。継代培養は、原則として5日に1回とし、細胞を Ca⁺⁺、Mg⁺⁺ 脱リン酸緩衝塩溶液 (PBS(-)) にて洗浄後、0.02% エチレンジアミン四酢酸を含む 0.1% トリプシン溶液 (EDTA-トリプシン) を、37°C で約3分間作用させて細胞分散し行

った。

4. 細胞増殖能の検索

対数増殖期にある細胞を EDTA-トリプシンで分散後、24 well プラスチックプレート (Corning, USA) に 1 well に 2×10^4 個の細胞を植え込んだ。

4 well を 1 群として各種濃度の FBS あるいは牛新生児血清 (NCS, M.A. Bioproduct, USA) を加えて培養し、2日目から10日目までの生細胞数を Coulter Counter (Coulter Electronics, England) にて算出した。

5. 染色体数の検索

対数増殖期にある細胞の培養液中に、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ のコルセミド (Sigma, USA) を加え 4 時間培養した後、EDTA-トリプシンにて細胞を単離した。この細胞に 20 分間低張液 (0.075 M KCl) を作用させ、その後、カルノア液 (メタノール:氷酢酸 = 3:1) にて固定した。

固定後すみやかに風乾し、ギムザ染色を施し、光学顕微鏡観察および写真撮影を行い染色体数を算定した²²⁾。

6. ヌードマウスへの移植

Laminar Flow Iso Rack (三基科学工業 K.K.) 中で specific pathogen free の条件下に飼育されたヌードマウス (BALB/c nu/nu 5 週齢♀日本クレア K.K.) の背部皮下に 1×10^7 個の細胞を接種した。形成された腫瘍は 10% ホルマリン緩衝液にて固定し、パラフィン包埋した後、薄切し、H-E 染色を施し光学顕微鏡にて観察した。

7. インターロイキン-1 (IL-1) 様物質の産生に関する検索

1) 培養上清の調整

DMEM (10% FBS) 3 ml 中に 2×10^5 個の細胞を浮遊させ、60 mm dish に植え込んだ。培養後 1~9 日目の上清を採取し、 $0.22 \mu\text{m}$ MILEX-GV Filter Unit (日本ミリポア工業 K.K.) にて濾過後、IL-1 活性を測定した。

2) Thymocyte Proliferation Assay

Thymocyte proliferation assay は、Luger⁹⁾ の方法に準じて行った。すなわち、LPS 不応系である C3H/HeNCrj マウス (日本チャールズリバー K.K.) より胸腺細胞を採取した。単離した細胞を 1% FBS, $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 2-メルカプトエタノール (2-ME, Sigma, USA) を加えた RPMI 中に浮遊させ、 $1 \times 10^5/150 \mu\text{l/well}$ となるように 96 well plate (Corning, USA) に添加した。1 群を 4 well とし、これに、それぞれ試料 $50 \mu\text{l}$ および $1.0 \mu\text{g/ml}$ の PHA を加え 72 時間培養した。最後の 16 時間で $0.5 \mu\text{Ci/well}$ の [methyl- ^3H] Thymidine ([^3H]-TdR, Amersham International plc, England) により細胞をラベルした。ラベル後、PBS (-) で胸腺細胞を 3 回洗浄し、細胞に取り込まれた ^3H 活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

3) Fibroblast Proliferation Assay

Fibroblast proliferation assay は、Schmidt²³⁾ の方法に従った。IL-1 活性の測定に用いた線維芽細胞は口唇裂手術時の余剰口唇組織の培養により得た。継代 2~5 代の線維芽細胞を DMEM (10% FBS) 中に浮遊させ、96 well plate に $5 \times 10^3/150 \mu\text{l/well}$ 植え込んだ。24 時間培養の後 $50 \mu\text{l}$ の試料を加え、さらに 48 時間培養した。最後の 16 時間を [^3H]-TdR $0.25 \mu\text{Ci/well}$ でラベルした後、PBS (-) にて各 well を洗浄、細胞に取り込まれた ^3H 活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

なお、IL-1 活性はすべて対照を 1 とした比で表した。

4) Gel Filtration による分析

i) ヒトマクロファージ IL-1 の調整

正常の成人男性より採取した 50 ml の末梢血より単核球を分離し、 75 cm^2 培養用フラスコ (Corning, USA) にて 2 時間培養し、フラスコに吸着した細胞をマクロファージフラクションとした。これに、40 ml RPMI, $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ 2-ME, 1% FBS, $50 \mu\text{g/ml}$ シリカ、そして $10 \mu\text{g/ml}$ LPS (DIFCO Lab. USA) をそれぞれ加え、さらに 2 日培養し上清を採取した。こうして得られた上清 400 ml を集め $0.22 \mu\text{m}$ MILLEX-GV Filter Unit にて濾過し、硫酸分画により 70% 飽和画分を採取、これをリン酸緩衝塩溶液 (PBS(+)) に対して透析し、試料とした。

ii) 培養上清の調整

Nakata-1 細胞 1×10^6 個を 10 ml の DMEM (10% FBS) 中に浮遊させ、10 cm plastic dish (Corning, USA) に植え込み、5 日間培養の後上清を採取した。500 ml の上清を集め、硫酸分画により 70% 飽和画分を採取、これを 0.02 M NaPB (pH 7.4) に対して透析した。これに、同じ緩衝液で平衡化した pack volume 50 ml の DEAE Sephacel を加え、 4°C で 1 時間攪拌し余分のタンパクを吸着させた後、濾紙にて濾過し未吸着フラクションを採取した²⁴⁾。得られた濾液を DIAFLO Ultrafilter Membrane YM-10 (Amicon グレースジャパン K.K.) を用いた限外濾過法により、約 1 ml まで濃縮し、PBS (+) に対して透析した。

iii) Gel Filtration

濃縮した試料約 1 ml を $0.22 \mu\text{m}$ MILLEX-GV Filter Unit にて濾過し、PBS (+) に対して平衡化させた $2.6 \times 90 \text{ cm}$ Sephacryl S-200 (Pharmacia, Sweden) カラムにかけた。流速は、 16 ml/h とし、溶出した各 3 ml の fraction を回収した。各 fraction は、 $0.22 \mu\text{m}$ MILLEX-GV Filter Unit により濾過滅菌し、thymocyte proliferation assay により IL-1 活性を測定した。カラムの calibration には、Bovine Serum Albumin (6.7 KD), Obalbmin (4.3 KD), Chymotrypsinogen A (2.5 KD), Ribonuclease A (1.37 KD) (Gel Filtration Caribraion Kit, Pharmacia, Sweden) を用い

た。

結 果

1. 培養経過

写真1は Nakata-1 細胞を得た原発部腫瘍で、その組織像は、写真2のごとく高分化型の扁平上皮癌であった。写真3は、初代培養時の Nakata-1 細胞を示したもので、腫瘍塊より多角形の上皮様細胞の増殖が見られた。上皮様細胞が full sheet に達した昭和60年2月■日第1回目の継代を行い、以後原則として5日に1回の継代を行った。写真4は、継代25代の Nakata-1 細胞の顕微鏡像で、多角形の上皮様細胞がみられた。

2. 細胞増殖能

図1、2に継代25代、72代の Nakata-1 細胞の増殖曲線を示した。いずれも10% FBS を加えた時、最大の増殖能を示したが、72代においては、1% FBS を加えた時でも10% FBS と変わらない増殖能を示した。継代25

写真1 Nakata-1 を得た原発部腫瘍

写真2 原発部腫瘍の組織像 (x100)

腫瘍組織は癌真珠や細胞間橋の形成等明らかな扁平上皮の性格を示し、腫瘍細胞には、核や細胞の大小不同、外核の細胞の出現や異型核分裂像の出現等かなり強い細胞異型性が観察される。

写真3 初代培養時の Nakata-1 細胞 (x100)

写真4 継代25代の Nakata-1 細胞 (x100)

図1 継代25代における細胞増殖曲線

図 2 継代72代における細胞増殖曲線

代での細胞倍加時間は、21.8時間、72代では18.6時間であった。

3. 染色体数

図3は、継代11代 Nakata-1 細胞の染色体数の分布を示したもので、染色体数は55~153の範囲に分布し、モードは85であった。

継代72代では、染色体数は54~157の範囲に分布し、モードは73であった。

4. ノードマウスへの移植

写真5は継代9代の Nakata-1 細胞のノードマウス移

写真 5 ノードマウス移植腫瘍の組織像 (×100)

図 3 継代11代における染色体数の分布

植腫瘍の組織像で、原発巣に似た角化傾向の強い、細胞間橋の明瞭な高分化型の扁平上皮癌であった。

5. 培養上清中の IL-1 活性について

Nakata-1 細胞の培養上清中の IL-1 活性は、thymocyte proliferation assay においては、5 日目にほぼ

図 4 培養上清中の IL-1 活性の変動

図 5 ヒトマクロファージより得られた IL-1 のゲル濾過における IL-1 活性の溶出パターン

図 6 Nakata-1 細胞の培養上清中の IL-1 活性のゲル濾過における溶出パターン

ピークに達し、9日目では、減少した。fibroblast proliferation assay においては、9日目まで徐々に増加した(図4)。

6. Gel Filtration による分析

図5は、マクロファージより得られた IL-1 のゲル濾過での IL-1 活性の溶出パターンを示したもので、IL-1 活性のピークは、分子量約15,000付近に溶出した。Nakata-1 の培養上清中の IL-1 活性は、マクロファージ IL-1 と同様の溶出パターンを示した(図6)。

考 察

培養技術の発達とともに、多くの細胞株の樹立が報告されている。特に悪性腫瘍由来のものについては、種々の臓器腫瘍由来のものが樹立されている^{25,26)}。口腔領域由来のものは Moore らの Hep 3 細胞³⁸⁾に始まるが、文献的報告のあるものは少ない²⁹⁻⁴⁵⁾。

Nakata-1 細胞は、大星⁴⁶⁾、山田⁴²⁾らがあげている培養細胞の持つ特徴のうちで、(1)安定した増殖能 (2)染色体構成の異数性 (3) *in vivo* での腫瘍形成、といった条件を満たしていた。

IL-1 様物質の上皮細胞による産生は Luger らにより示され⁹⁾、Epidermal cell-derived Thymocyte Activating Factor (ETAF) と名づけられた。この物質の IL-1 との類似性は Luger ら⁴⁷⁾により示されている。この ETAF を始めとして多くの正常細胞が、IL-1 様の物質を産生することが報告されている。さらに、Luger ら¹⁹⁾はケラチノサイト由来の悪性腫瘍である扁平上皮癌の1例で IL-1 様物質が産生されることを示した。その後、悪性腫瘍においてはメラノーマ²¹⁾、神経膠

芽腫⁴⁸⁾などで IL-1 様物質の産生が報告されているが、口腔領域扁平上皮癌による産生の報告はない。

IL-1 の作用は多種にわたるが、一般に、免疫系細胞の活性化、炎症反応の促進などがあげられる。このような物質を腫瘍細胞が産生することは、非常に興味深いことである。

Nakata-1 細胞の産生する物質は、fibroblast proliferation assay および thymocyte proliferation assay の両者に活性を示し、しかもこの活性はヒトマクロファージ IL-1 と Sephacryl S-200 カラムによるゲル濾過においても同様の挙動を示すことから、この物質が IL-1 に近いものと考えられた。

IL-1 の抗腫瘍作用⁵⁰⁾の機序は T cell に対して Interferon, IL-2 などの液性因子の産生、T cell の IL-2 receptor の発現、cytotoxic T cell の誘導、natural killer cell の活性化、単球の抗腫瘍活性の増強など⁴⁹⁾が考えられている。また、IL-1 は、腫瘍細胞に対して直接、cytostatic あるいは cytotoxic に働くともいわれている⁵¹⁾。

しかしながら、IL-1 は線維芽細胞に対して Prostaglandins (PGs)、特に PGE₂ を産生させる作用を持つ⁵²⁾。IL-1 や PGE₂ は骨吸収作用を持っており^{53,54)}、免疫系、あるいは腫瘍細胞に複雑な作用を示す⁵⁵⁾ことが知られている。また、PGE₂ により線維芽細胞は collagenase を産生する⁵⁵⁾といわれている。これらの作用が局所における腫瘍細胞の浸潤、増殖に関与していることも考えられる。

一方、メラノーマや肝細胞癌の細胞に IL-1 に対する receptor が存在することが報告されている⁵⁶⁾。いまだ、IL-1 が腫瘍細胞の増殖を促進する事実は認められていないが、腫瘍細胞の産生する IL-1 あるいは、IL-1 様

物質が腫瘍の転移, 浸潤, 増殖になんらかの形で関わっている可能性は十分に考えられる。

腫瘍細胞の産生する IL-1 様物質と IL-1 との異同とともに, このような物質と腫瘍との関係を明らかにすることは, 癌と免疫との関係を明らかにする上で重要な課題と考えられる。

結 語

頬粘膜扁平上皮癌より株化細胞 (Nakata-1) の樹立に成功した。同細胞の培養上清中にはマクロファージより得られた IL-1 と一致した性質を示す IL-1 活性が存在し, Nakata-1 細胞が IL-1 様物質を産生する可能性が示された。

引 用 文 献

- 1) Sporn, G.J. and Tudaro, M.B.: Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* 303: 878-880 1980.
- 2) Massague, J.: The transforming growth factors. *Trends Biol Sci* 10: 237-240 1985.
- 3) 梅田 誠: Transforming growth factor「細胞成長因子」・日本組織培養学会編. 朝倉書店, 東京, 1984, 99-105頁.
- 4) Vallee, B.L., Riordan, J.F., et al.: Tumor-derived angiogenesis factor from rat Walker 256 carcinoma: an experimental investigation and review. *Experientia* 41: 1-142 1985.
- 5) Hyodo, T., Megyesi, K., et al.: Adrenocortical carcinoma and hypoglycemia: Evidence for production of nonsuppressible insulin-like activity by the tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 44: 1175-1184 1977.
- 6) Pavelic, K.: Aplastic carcinoma in diabetic mice: Hyperglycemia-suppressed proliferation rate and insulin synthesis by tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 62: 139-141 1979.
- 7) Dinarello, C.A.: Interleukin-1. *Rev Infect Dis* 6: 51-95 1984.
- 8) Kampschmidt, R.F.: The numerous postulated biological manifestations of interleukin-1. *J Leukocyte Biol* 36: 341-355 1984.
- 9) Luger, T.A., Stadler, B.M., et al.: Epidermal cell (keratinocyte)-derived thymocyte-activating factor (ETAF). *J Immunol* 127: 1493-1498 1981.
- 10) Luger, T.A. and Oppenheim, J.J.: Characteristics interleukin 1 and epidermal cell-derived thymocyte activating factor. *Adv Inflammation Res* 5: 1-25 1983.
- 11) Sauder, D.N., Carter, C.S., et al.: Epidermal cell production of thymocyte activating factor

- (ETAF). *J Invest Dermatol* 79: 34-39 1982.
- 12) Sauder, D.N., Dinarello, C.A., et al.: Langerhans cell production of interleukin-1. *J Invest Dermatol* 82: 605-607 1984.
- 13) Fontana, A., Kristensen, F., et al.: Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C₆ glioma cells. *J Immunol* 129: 2413-2419 1982.
- 14) Miossec, P., Cavender, D., et al.: Production of interleukin 1 by human endothelial cells. *J Immunol* 136: 2486-2491 1986.
- 15) Grabner, G., Luger, T.A., et al.: Corneal epithelial cell-derived thymocyte-activating factor (CETAF). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23: 757-763 1982.
- 16) Iribe, H., Koga, T., et al.: Stimulating effect of MDP and its adjuvant-active analogues on guinea pig fibroblasts for the production of thymocyte-activating factor. *J Exp Med* 157: 2190-2195 1983.
- 17) Okai, Y., Tashiro, H., et al.: 3T3 fibroblasts are stimulated by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate to produce thymocyte-activating factors. *FEBS Lett* 142: 93-95 1982.
- 18) Hauser, C., Saurat, J. H., et al.: Cultured human epidermis cells produce cell-associated interleukin-1 like prostaglandin E₂- and collagenase-stimulating factors. *Biochem Biophys Acta* 840: 350-355 1985.
- 19) Luger, T.A., Stadler, B.M., et al.: Characteristics of an epidermal cell thymocyte-activating factor (ETAF) produced by human epidermal cells and a human squamous cell carcinoma cell line. *J Invest Dermatol* 81: 187-193 1983.
- 20) Sauder, D.N., Mounessa, N.L., et al.: Chemotactic cytokine: The role of leukocytic pyrogen and epidermal cell thymocyte-activating factor in neutrophil chemotaxis. *J Immunol* 132: 828-832 1984.
- 21) Kokoschka, E.M., Luger, T.A., et al.: Melanoma cell production of an interleukin 1-like thymocyte activating factor. *Arch Dermatol Res* 276: 267 (Abstr) 1984.
- 22) 中井準之助, 山根 穰, 他編集: 組織培養. 朝倉書店, 東京, 1976, 217-223頁.
- 23) Schmidt, J.A., Mizel, S.B., et al.: Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol* 128: 2177-2182 1982.
- 24) 松島綱治: 線維芽細胞を用いたインターロイキン 1 (Interleukin 1) の定量. 免疫実験操作法 V. 日本免疫学会編, 1983, 3907-3912頁.
- 25) 関口守正, 鈴木利夫: わが国で培養樹立, 維持されている人癌由来細胞株. 組織培養 6: 527-548 1980.

- 26) 佐藤 博：日本で維持されている可移植性腫瘍株一覽表。癌と化学療法 11: 1-92 1984.
- 27) Moore, A.E., Sabachewsky, L., et al.: Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res* 5: 598-602 1955.
- 28) 堀越 勝, 木村義孝, 他：人の歯肉癌由来の細胞株の樹立 (第一報). 日口外誌 20: 10-16 1975.
- 29) 白田篤伸, 道 健一, 他：下顎歯肉扁平上皮癌頸部のリンパ節転移巣よりえられた新細胞株 (HSC-1) について. 口科誌 24: 61-74 1975.
- 30) 石田 稔：人癌細胞の培養—上顎癌由来の細胞株について— 日耳鼻 81: 588-603 1978.
- 31) 小池正夫, 五木田利明：ヒト歯肉癌由来の細胞株 (MK-1) の樹立とその性状. 日口外誌 26: 1481-1489 1980.
- 32) 田川俊郎：ヒト歯肉由来悪性黒色腫培養細胞に関する実験的研究. 日口外誌 27: 833-845 1981.
- 33) 猪川 勉：頭頸部扁平上皮癌細胞に対するリンパ球の細胞障害性の研究—1. 頭頸部扁平上皮癌細胞の培養—. 日耳鼻 84: 1570-1578 1981.
- 34) 小松正隆, 浦出隆裕：著明な角化傾向をもつ上顎扁平上皮癌由来株化細胞の樹立. 日口外誌 29: 1243-1248 1983.
- 35) 菱田市和：放射線照射をうけたヒト顎下唾液腺からの造腫瘍性細胞の分離. 阪大歯誌 29: 36-63 1984.
- 36) 百瀬文雄, 平田章二, 他：3つの口腔扁平上皮癌由来細胞の性状について. 口科誌 35: 485-496 1986.
- 37) Okabe, T., Sato, N., et al.: Establishment and characterization of a human cancer cell line that produces human colony stimulating factor. *Cancer Res* 38: 3910-3917 1978.
- 38) Eagle, H.: Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. (21811). *Proc Soc Exp Biol Med* 89: 362-364 1955.
- 39) Zenner, H.P., Lehner, W., et al.: Establishment of carcinoma cell lines from larynx and submandibular gland. *Arch Otorhinolaryngol* 225: 269-277 1979.
- 40) Rheinwald, J.G. and Beckett, M.A.: Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 41: 1657-1663 1981.
- 41) Easty, D.M., Easty, G.C., et al.: Ten human carcinoma cell lines derived from squamous carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 43: 772-785 1981.
- 42) Easty, D.M., Easty, G.C., et al.: Five human tumour cell lines derived from a primary squamous carcininoma of the tongue, two subsequent local recurrences and two nodal metastases. *Br J Cancer* 44: 363-370 1981.
- 43) Zenner, H.P., Herrmann, I.F., et al.: Head and neck carcinoma models. *In vivo* reproduction in athymic mice and *in vitro* culture. *Acta Otolaryngol* 95: 371-381 1983.
- 44) Huang, D.P., Ho, J.H.C., et al.: Establishment of a cell line (NPC/HK 1) from a differentiated squamous carcinoma of the nasopharynx. *Int J Cancer* 26: 127-132 1980.
- 45) Nishihira, T., Kasai, M., et al.: Characteristics of two cell lines (TE-1 and TE-2) derived from human squamous cell carcinoma of the esophagus. *Gann* 70: 575-584 1979.
- 46) 大星章一, 菅野晴夫編纂：人癌細胞の培養. 朝倉書店, 東京, 1975, 95-104頁.
- 47) Luger, T.A., Atadler, B.M., et al.: Murine epidermal cell-derived thymocyte-activating factor resembles murine interleukin 1. *J Immunol* 128: 2147-2152 1982.
- 48) Fontana, A., Hengartner, H., et al.: Glioblastoma cells release interleukin 1 and factors inhibiting interleukin 2 mediated effects. *J Immunol* 132: 1837-1844 1984.
- 49) Oppenheim, J.J., Kovacs, E. J., et al.: There is more than one interleukin 1. *Immunology Today* 7: 45-56 1986.
- 50) Onozaki, K., Matsushima, K., et al.: Role of interleukin-1 in promoting human monocyte-mediated tumor cytotoxicity. *J Immunol* 135: 314-320 1985.
- 51) Onozaki, K., Matsushima, K., et al.: Human interleukin 1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines. *J Immunol* 135: 3962-3968 1985.
- 52) 中野昌康：内毒素の生物活性—免疫系に対する作用 (内毒素—その構造と活性). 医歯薬出版, 東京, 1983, 259-288頁.
- 53) Chambers, T.J., McSheehy, P.M.J., et al.: The effect of calcium-regulating hormones and prostaglandins on bone resorption by osteoclasts disaggregated from neonatal rabbit bones. *Endocrinol* 116: 234-239 1985.
- 54) Thomson, B.M., Saklatvala, J., et al.: Osteoblasts mediate interleukin 1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. *J Exp Med* 164: 104-112 1986.
- 55) Postlethwaite, A.E., Lachman, L.B., et al.: Interleukin 1 stimulation of collagenase production by cultured fibroblasts. *J Exp Med* 157: 801-806 1983.
- 56) Dower, S.K., Kronheim, S.R., et al.: Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. *J Exp Med* 162: 501-515 1985.