

Biological response modifier としての Tumor necrosis factor の効果に対する Immunosuppressive substance の作用の検討

岡山大学医学部第一外科学教室 (指導: 折田薫三教授)

安 井 義 政

(平成3年11月5日受稿)

Key words : biological response modifier (BRM), tumor necrosis factor (TNF), immunosuppressive substance (IS 物質), natural killer (NK) 活性

緒 言

近年, 大量細胞培養や遺伝子組換え技術の進歩により, 種々のサイトカインが量産され, 臨床応用が進められている。これらのサイトカインには, 直接的な抗腫瘍効果だけでなく, 最近では宿主の生物学的反応, 特に免疫能を修飾する biological response modifier (BRM) としての作用に期待が寄せられている。

活性化マクロファージ由来の tumor necrosis factor α (TNF- α), リンパ球由来の TNF- β (いわゆる lymphotoxin) もその一つである。これら TNF の *in vitro* および *in vivo* における抗腫瘍効果については多数の報告^{1)~4)}が見られる。さらに BRM としては好中球貪食能の亢進⁵⁾, マクロファージの活性化⁶⁾など免疫担当細胞に対する様々な活性が明らかになりつつある。しかし, natural killer (NK) 細胞を中心とする NK 活性に対する TNF の作用については種々の報告^{6),7)}が見られるが, 未だその見解は一致していない。

その一因としては, TNF を投与される宿主側の免疫学的状況に差があることが考えられる。担癌患者では, 健常人に比べて免疫能が著しく低下していることが知られている。その原因として, 種々の免疫抑制因子の存在が指摘される。藤井ら⁸⁾によって, 大腸癌患者腹水より抽出され, 癌患者血清中に大量に存在する免疫抑制物質

immunosuppressive substance (ISS) もその一つである。この ISS は, *in vitro* で NK 活性や PHA 幼若化反応などの細胞性免疫を抑制することが報告⁹⁾されており, 当然, 担癌患者における BRM の作用に対して大きな影響を及ぼすことが考えられる。

本報では, TNF の NK 活性に対する効果について検討し, 特に健常人と担癌患者での作用の相違を明らかにした。さらにこれに関連して, BRM としての TNF の効果に対する ISS の作用についても併せて検討した。

材料と方法

1. Tumor necrosis factor (TNF) および interferon (IFN)

使用した TNF と IFN は林原生物化学研究所より供与されたもので hemagglutinating virus of Japan (HVJ) の刺激により, ヒト急性白血病由来の BALL-1 細胞から産生された natural human TNF- α , natural human TNF- β , natural human IFN- α (TNF- α , TNF- β , IFN- α と略す)^{9)~11)}と, リポポリサッカライドの刺激により HBL-38細胞から産生された natural human IFN- γ (IFN- γ と略す)¹²⁾を用いた。TNF- α と TNF- β の定量は Eifel ら¹³⁾の方法により, Actinomycin D で処理したマウス L929 細胞に対する細胞障害活性に基づいて決定された。なお実験中の各サイトカインの濃度は, TNF

は林原単位で、IFN は国際単位 (IU) で示した。また各サイトカインの比活性は、TNF- α は 1×10^9 U/mg protein, TNF- β は 5×10^8 U/mg protein, IFN- α は 2×10^8 IU/mg protein, IFN- γ は 2.1×10^7 IU/mg protein である。

2. Immunosuppressive substance (ISS) および抗 IS 血清

ISS および抗 IS 血清は呉羽化学工業㈱より供与された。ISS⁹⁾は末期大腸癌患者腹水から抽出した分子量約52,000の糖蛋白である。即ち、大腸癌患者腹水に硫酸アンモニウムを加え、60%飽和で沈澱する画分を除去し、上清をセルロース・アセテートの透析膜を用い純水に透析後、凍結乾燥する。さらに、LKB 社440および110等電点電気泳動カラムにて、pH2.5~6.0のアンフォラインを用いて泳動分画し、pH2.7~3.3の画分を得、純水に透析し、凍結乾燥処理してISSを得る。また抗 IS 血清¹⁰⁾は、ISSを純水に溶かし、Freund's complete adjuvant とともに (ISS 1~2 mg/家兎)、家兎の皮下に2週間間隔で4~5回注射し、最終免疫の7~10日後に採血して作製した抗血清で、phosphate-buffered saline (PBS, pH7.2) に溶解したもので、蛋白濃度は36.3mg/mlである。ISSの定量は Mancini ら¹⁴⁾の一元免疫拡散法にて測定した。

3. Natural killer (NK) 活性の測定

ヘパリン加健康人または消化器末期癌患者の末梢血から Ficoll-Conray 法により単核球 (peripheral blood mononucleocyte, PBMC) 分画を分離し、Hepes (10mM), streptomycin (50mg/ml), penicillin (100mg/ml) および10% fetal calf serum (FCS) を添加した RPMI1640 (complete medium, CM と略す) に浮遊した。これらの PBMC に CM で溶解した種々の濃度のサイトカインや ISS, 抗 IS 血清を添加し、37°C, 5% CO₂ で2~6時間培養して前処置を行った。control としては CM のみを添加し同様に前処置した PBMC を用いた。medium (RPMI1640) で3回洗浄後、CM に 2.5×10^6 cells/ml となるように浮遊し effector cell とした。またヒト白血病由来 NK 感受性株 K562 に Na⁵¹CrO₄ を 100μ Ci/ 10^6 cells 加え、37°C, 5% CO₂ で1時間培養後、medium (RPMI1640)

で3回洗浄し 5×10^4 cells/ml となるように CM に浮遊し、target cell とした。次いで、丸底96-well microtiter plate (Falcon 社製) を使用し、各 well に effector cell 2.5×10^5 cells/well と、target cell 5×10^3 cells/well (E/T ratio 50:1) を加え37°C, 5% CO₂ で4時間培養後上清100 μ lを採り、 γ -counter にてその放射活性を測定し、experimental cpm とした。maximum cpm は target cell 5×10^3 cells の放射活性を、spontaneous cpm は target cell 5×10^3 cells を CM のみで培養した際の上清中の放射活性を測定し、次式により NK 活性を算出した。なお、実験はすべて triplicate で行った。

$$\text{NK 活性 (\%)} = \frac{\text{experimental cpm} - \text{spontaneous cpm}}{\text{maximum cpm} - \text{spontaneous cpm}} \times 100$$

4. 統計処理

算出した値は mean \pm SD (standard deviation) として表示し、有意差検定は Student's *t* test を用いて行い、 $p < 0.05$ をもって有意と判定した。

結 果

1. 健康人 PBMC の NK 活性に対する TNF の効果

健康人 PBMC を effector cell とする NK 活

Table 1 Effect of TNF- α on NK activity of healthy donors

TNF- α (U/ml)	Preincubation period ^{a)} (hr)			
	0	2	4	6
0	32.5 \pm 3.3 ^{b)}	31.8 \pm 6.3	34.8 \pm 7.1	35.1 \pm 3.8
10 ¹		37.3 \pm 4.8	39.8 \pm 10.1	50.8 \pm 8.0 ^{d)}
10 ²		32.3 \pm 6.8	46.3 \pm 5.6 ^{d)}	54.7 \pm 4.8 ^{d)}
10 ³		34.3 \pm 7.0	50.1 \pm 5.4 ^{d)}	55.3 \pm 5.6 ^{d)}
10 ⁴		35.8 \pm 3.1	45.3 \pm 4.7 ^{d)}	51.1 \pm 8.1 ^{d)}
10 ⁵		40.6 \pm 7.4	50.8 \pm 9.1 ^{d)}	50.4 \pm 4.7 ^{d)}

a) PBMC of healthy donors were incubated with various doses of TNF- α before 4-hr ⁵¹Cr release assay.

b) Mean \pm SD of NK activity (%) of PBMC isolated from five healthy donors.

c) Control value was obtained by direct cytotoxic assay without TNF- α .

d) Statically significant enhancement as compared with the control ($p < 0.05$).

性は、 $32.5 \pm 3.3\%$ であった。この PBMC に $10^1 \sim 10^5$ U/ml の TNF- α を添加して前処置した場合いずれの条件下でも、control に比べて NK 活性は増強され、特に、 10^2 U/ml 以上の添加で 4 時間以上、または 10^4 U/ml でも 6 時間培養した場合には、有意な増強が認められた ($p < 0.05$)。最も効果的なのは 10^3 U/ml の TNF- α で 6 時間の前処置をした場合で、NK 活性は $55.3 \pm 5.6\%$ まで上昇した (Table 1)。同様の傾向は TNF- β を添加した場合にも認められ、 10^3 U/ml の濃度では 4 時間以上、さらに、 10^1 U/ml または 10^4 U/ml の場合でも 6 時間の前処置により、control に対して有意な NK 活性の増強が認められた ($p < 0.05$) (Table 2)。しかし、TNF- α と TNF- β 添加群の間では有意差は認めなかった。

2. 消化器末期癌患者 PBMC の NK 活性に対する TNF の効果

胃癌の進行度分類¹⁵⁾で Stage IV 3 例、大腸癌の進行度分類¹⁶⁾で Stage V 2 例の担癌患者より分離した PBMC の NK 活性は $14.1 \pm 3.8\%$ で健常人のそれに比べて有意に低値を示した ($p < 0.01$)。この担癌患者の PBMC に、健常人と同じ条件で、 $10^1 \sim 10^5$ U/ml の濃度の TNF- α を添加し 2 ~ 6 時間の培養による前処置を行い NK 活性を測定した。しかし、何れの場合でも活性の増強は認められず、control とほぼ同様の値を示すに止まった (Table 3)。TNF- β についても同じ前処置を試みたが、有意な活性の増強は

Table 2 Effect of TNF- β on NK activity of healthy donors

TNF- β (U/ml)	Preincubation period ^{a)} (hr)			
	0	2	4	6
0	$32.5 \pm 3.3^{b,c)}$	31.5 ± 8.2	32.1 ± 8.1	29.8 ± 5.4
10^1	30.1 ± 9.3	28.3 ± 5.1	36.2 ± 8.9	
10^2	30.4 ± 4.2	35.3 ± 3.8	$42.4 \pm 6.1^{d)}$	
10^3	30.9 ± 3.8	$41.7 \pm 6.6^{d)}$	$43.4 \pm 8.2^{d)}$	
10^4	34.9 ± 2.1	35.6 ± 6.7	$40.9 \pm 8.6^{d)}$	
10^5	24.8 ± 6.4	30.8 ± 6.3	36.3 ± 7.2	

- a) PBMC of healthy donors were incubated with various doses of TNF- β before 4-hr ^{51}Cr release assay.
 b) Mean \pm SD of NK activity (%) of PBMC isolated from five healthy donors.
 c) Control value was obtained by direct cytotoxic assay without TNF- β .
 d) Statically significant enhancement as compared with the control ($p < 0.05$).

認めなかった (Table 4)。

3. NK 活性抑制系におよぼすサイトカインの効果

健常人 PBMC に $250 \sim 1000 \mu\text{g/ml}$ の ISS のみを添加した場合、その NK 活性は濃度依存性に低下し、 $1000 \mu\text{g/ml}$ では、ISS 無添加群の活性に比べて有意の抑制が見られた ($p < 0.05$)。この種々の濃度の ISS による NK 活性抑制系に対し、それぞれ 10^3 U/ml のサイトカインを単独または併用で添加し、6 時間培養後の活性の変化を見た。TNF- α または TNF- β を単独で投与した場合、ISS 無添加の状態でも活性は有意に増強された ($p < 0.05$)。しかし、ISS を添加した場合には ISS の何れの濃度でも値の上昇は見られず、むしろ ISS 単独添加した群よりもさらに低

Table 3 Effect of TNF- α on NK activity of gastrointestinal cancer patients

TNF- α (U/ml)	Preincubation period ^{a)} (hr)			
	0	2	4	6
0	$14.1 \pm 3.8^{b,c)}$	13.8 ± 4.1	13.1 ± 4.2	13.5 ± 2.1
10^1		12.7 ± 3.5	13.9 ± 5.1	13.6 ± 2.8
10^2		11.3 ± 1.3	12.1 ± 1.7	13.6 ± 2.5
10^3		14.0 ± 5.1	13.0 ± 2.4	14.8 ± 4.7
10^4		14.1 ± 3.3	11.2 ± 1.5	14.7 ± 1.9
10^5		10.8 ± 3.1	12.8 ± 2.0	13.9 ± 3.0

- a) PBMC of cancer patients were incubated with various doses of TNF- α before 4-hr ^{51}Cr release assay.
 b) Mean \pm SD of NK activity (%) of PBMC isolated from five cancer patients.
 c) Control value was obtained by direct cytotoxic assay without TNF- α .

Table 4 Effect of TNF- β on NK activity of gastrointestinal cancer patients

TNF- β (U/ml)	Preincubation period ^{a)} (hr)			
	0	2	4	6
0	$14.1 \pm 3.8^{b,c)}$	16.2 ± 6.3	13.1 ± 3.5	15.3 ± 4.7
10^1		15.0 ± 2.8	15.2 ± 5.0	16.2 ± 3.6
10^2		14.3 ± 3.2	14.8 ± 2.7	15.6 ± 2.5
10^3		11.3 ± 6.4	15.1 ± 3.1	15.9 ± 4.8
10^4		14.8 ± 3.7	13.9 ± 4.1	16.1 ± 6.0
10^5		13.9 ± 2.9	14.5 ± 3.8	16.0 ± 4.4

- a) PBMC of cancer patients were incubated with various doses of TNF- β before 4-hr ^{51}Cr release assay.
 b) Mean \pm SD of NK activity (%) of PBMC isolated from five cancer patients.
 c) Control value was obtained by direct cytotoxic assay without TNF- β .

下する傾向がみられた。次にこのNK活性抑制系において、TNF- α 10^3 U/mlとIFN- α 10^3 IU/ml、またはTNF- α 10^3 U/mlとIFN- γ 10^3 IU/ml即ち生理学的活性比で1:1併用投与を行った。ISS無添加の場合、controlに対して有意の増強を認め ($p < 0.05$)、TNF- α 単独投与よりもさらにNK活性は上昇したが、各サイトカイン添加群の間では有意差は見られなかった。またISSを添加した抑制系の場合でも、TNF- α 単独投与に比べてNK活性の改善が認められた (Fig. 1)。

4. 消化器末期癌患者 PBMC のNK活性に対する抗IS血清およびTNFの効果

担癌患者PBMCに、*in vitro* で1000 μ g/mlの濃度のISSの作用を中和しうる量の抗IS血清 (蛋白濃度1.5mg/ml)を添加した。これにTNFを加え6時間培養した後、NK活性を測定した。抗IS血清単独でも活性の上昇が認められたが、

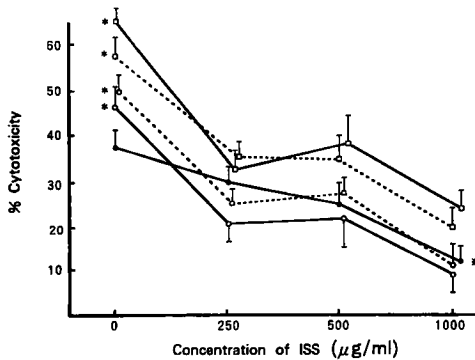


Fig. 1 Effect of cytokines on NK activity suppressed by ISS. PBMC supplemented with ISS alone or with ISS and cytokine were incubated for 6 hours before 4-hr ^{51}Cr release assay. ●—●, ISS alone; ○—○, ISS+TNF- α (10^3 U/l); ○—○, ISS+TNF- β (10^3 U/l); □—□, ISS+TNF- α (10^3 U/l)+IFN- α (10^3 IU/l); □—□, ISS+TNF- α (10^3 U/l)+IFN- γ (10^3 IU/l). Plots, mean \pm SD (bars) of five cases. *, Significant enhancement ($p < 0.05$) as compared with the control of NK activity of absence of ISS and cytokines. **, Significant suppression ($p < 0.01$) as compared with the control.

TNF- α の添加により何れの濃度でもさらに若干の活性の増強が見られた (Table 5)。同様に、TNF- β で前処置した場合にも、抗IS血清単独投与群よりも軽度の活性の上昇が認められた (Table 6)。

考 察

TNFは1975年に Carswell ら¹⁾によって発見されたマクロファージ由来の polypeptide である。一方、活性化リンパ球より放出される抗腫瘍性リンフォカインとして lymphotoxin が知ら

Table 5 Effect of TNF- α on NK activity of PBMC of gastrointestinal cancer patient pretreated with or without anti-IS antiserum

TNF- α ^{b)} (U/ml)	Pretreatment with anti-IS antiserum ^{a)}	
	⊖	⊕
0	12.6 \pm 4.5 ^{c)}	20.5 \pm 6.8
10^1	13.5 \pm 3.8	24.2 \pm 6.1
10^2	12.3 \pm 3.1	23.6 \pm 7.8
10^3	12.7 \pm 5.7	25.5 \pm 4.4
10^4	13.1 \pm 4.1	25.7 \pm 3.1
10^5	13.5 \pm 2.9	24.0 \pm 5.7

a) Anti-IS antiserum was supplemented over the quantity neutralizing the suppressive effect of $10^3\mu\text{g/ml}$ of ISS on NK activity of healthy donor *in vitro*.

b) Various doses of TNF- α were supplemented and incubated for 6 hours before 4-hr ^{51}Cr release assay.

c) Mean \pm SD of NK activity (%) of pretreated PBMC prepared from five cancer patients.

Table 6 Effect of TNF- β on NK activity of PBMC of gastrointestinal cancer patient pretreated with or without anti-IS antiserum

TNF- β ^{b)} (U/ml)	Pretreatment with anti-IS antiserum ^{a)}	
	⊖	⊕
0	15.3 \pm 3.5 ^{c)}	21.8 \pm 4.6
10^1	14.1 \pm 2.9	23.5 \pm 6.1
10^2	13.9 \pm 5.3	24.8 \pm 8.6
10^3	15.6 \pm 4.5	24.1 \pm 6.4
10^4	15.0 \pm 3.3	25.8 \pm 7.8
10^5	13.1 \pm 3.6	25.1 \pm 3.9

a) Anti-IS antiserum was supplemented over the quantity neutralizing the suppressive effect of $10^3\mu\text{g/ml}$ of ISS on NK activity of healthy donor *in vitro*.

b) Various doses of TNF- β were supplemented and incubated for 6 hours before 4-hr ^{51}Cr release assay.

c) Mean \pm SD of NK activity (%) of pretreated PBMC prepared from five cancer patients.

れている¹⁷⁾。これら二つのサイトカインには35%のアミノ酸の同一性と50%の相同性を有し^{21,18)}、標的細胞に対して共通の受容体に結合する²⁾ことから、TNF を TNF- α 、lymphotoxin を TNF- β として一括して扱われている¹⁹⁾。TNF- α 、および TNF- β は、ともに *in vitro* あるいは *in vivo* において抗腫瘍活性を有する物質として報告¹⁾⁻⁴⁾されてきたが、最近では、種々の生物学的活性を有し、白血球の遊走能、食食能や細胞障害活性の増強⁵⁾、内皮における凝固活性の発現^{20),21)}、他のサイトカインの誘導など、炎症や免疫学的反応の際に、重要な mediator として働くことがわかり注目を集めている²²⁾⁻²⁴⁾。そして、このような BRM としての TNF と、NK 活性との関係についても様々な報告が見られる^{6),7)}。今回の成績では、健常人の PBMC を effector cell とした場合、TNF- α または TNF- β の添加による前処置により、NK 活性は有意に増強されることが示された。これに対して消化器末期癌患者の PBMC では、TNF- α 、TNF- β の何れの濃度でも活性は増強されなかった。即ち、健常人と担癌患者といった宿主側の要因により BRM としての TNF の作用に相違が生じることが認められた。

周知のとおり、担癌宿主では癌の進行度と 관련된免疫能の低下が見られ、この一因として、癌患者血清中に種々の免疫抑制因子となりうる糖蛋白が上昇することが知られている。今回実験に用いた ISS も、これら免疫抑制因子の一つである。ISS は藤井ら⁸⁾により大腸癌患者腹水から抽出された等電点2.7~3.3、分子量約52,000の糖蛋白である。この物質は、*in vitro* でNK活性や PHA 幼若化反応の抑制⁹⁾、lymphokine activated killer (LAK) 細胞における IL-2 receptor 発現の抑制²⁵⁾、*in vivo* ではマウス遅延型足蹠反応を抑制する作用⁹⁾がある。また家兎を ISS で免疫して得られた抗 IS 血清を用いて血中濃度を測定すると、万波ら²⁶⁾が報告したように、正常人血清中にも存在するが730 μ g/ml以下であり、癌患者では癌の進行とともに増加し、1000 μ g/ml以上を認める。

本報では、健常人 PBMC に対し ISS を加えたものを NK 活性抑制系とし、*in vitro* にお

る担癌状態再現のモデルとした。この抑制された NK 活性系にサイトカインを添加したところ、TNF- α 、TNF- β 単独投与では活性は回復されず、むしろ低下する場合も見られ、消化器末期癌患者 PBMC での反応と同様の傾向が認められた。これらの免疫抑制状態あるいは担癌状態では、TNF の添加によって、PBMC における prostaglandin E₂ の産生が促進され²⁷⁾、この prostaglandin E₂ の免疫抑制作用により^{28),29)} NK 活性はさらに低下することが考えられる。しかし、TNF- α の場合、IFN- α または IFN- γ を生理学的活性比で1:1の比率で併用投与することにより、抑制された活性を改善しうることが示された。

次に、担癌患者の PBMC に、1000 μ g/ml の ISS の免疫抑制作用を中和しうる量の抗 IS 血清を添加した場合、抗 IS 血清単独でも NK 活性は上昇するが、TNF- α または TNF- β を投与することで、さらに活性は増強することが示された。このような TNF 単独投与による NK 活性の上昇傾向は、抗 IS 血清で処理していない担癌患者 PBMC では認められなかった。浜田ら³⁰⁾は、蛍光抗体法により、ISS が PBMC の表面に結合することを確認し報告しているが、今回の実験では、この結合した ISS の作用が、抗 IS 血清によって中和され、TNF の BRM としての作用が発現してくる可能性が推察された。

以上より、TNF- α および TNF- β には健常人の NK 活性を増強する作用が認められた。しかし、担癌患者においては、この効果が血清中に大量に存在する ISS により阻害されるため、NK 活性の増強という BRM としての作用が発揮されないものと考えられた。さらに、TNF の BRM としての作用を有効に引き出すためには、血清中の ISS を含めた免疫抑制因子の除去が適当と考えられるが、実際の臨床応用に際しては、IFN など他のサイトカインや、宿主の免疫能を修飾する化学療法剤との併用が有用であることが示唆された。

結 論

癌患者における、TNF のより有効な抗腫瘍効果の発現を目的とし、NK 活性を指標として種々

の検討を行った。

1. TNF- α および TNF- β で健常人の PBMC を前処置した場合、NK 活性を有意に増強することが認められた ($p < 0.05$).
2. 消化器末期癌患者の PBMC に対して TNF- α または TNF- β で前処置を行ったが、何れの場合も NK 活性の増強は見られなかった。
3. 健常人より採取した PBMC に、ISS を添加して NK 活性抑制系とし担癌状態を再現した。この抑制系では TNF- α または TNF- β の単独添加による前処置では NK 活性の上昇は見られず、むしろ ISS 単独添加群よりも低下する傾向が見られた。これに対して TNF- α と IFN- α , または TNF- α と IFN- γ を 1 : 1 の生理学的活性比で併用投与した場合 NK 活性は回復した。
4. 抗 IS 血清を添加した消化器末期癌患者の PBMC に、TNF- α または TNF- β を加えて前処置すると、健常人より有意に低かった ($p < 0.01$)

NK 活性は上昇し、改善が認められた。

以上より、TNF の NK 活性増強作用は健常人においては認められるが、担癌患者では認められなかった。即ち、担癌患者では血中に存在する ISS により TNF の BRM としての作用が阻害されている可能性が示唆された。また、TNF の効果を有効に引き出すには、ISS の除去や IFN など他のサイトカインとの併用が効果的であることが考えられた。

稿を終えるにあたり、終始御指導御校閲を賜った恩師折田薫三教授に深甚なる謝意を表すると共に、直接御指導頂いた淵本定儀講師に深謝いたします。また、実験の遂行にあたり御協力下さいました教室員各位に心より感謝の意を表します。

(本文の要旨は、第47回日本癌学会総会、15th International Cancer Congress にて発表した。)

文 献

- 1) Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N and Williamson B : An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumor. Proc Natl Sci USA (1975) **72**, 3666—3670.
- 2) Aggarwal BB, Eessalu TE and Hass PE : Characterization of receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by γ -interferon. Nature (1985) **318**, 665—667.
- 3) Naomoto Y, Tanaka N, Fuchimoto N and Orita K : In vitro synergistic effects of natural human tumor necrosis factor and natural human interferon- α . Jpn J Cancer Res (Gann) (1987) **78**, 87—92.
- 4) Orita K, Ando S and Kurimoto M : Synergism between human tumor necrosis factor and human interferon- α : effects on cells in culture. Acta Med Okayama (1987) **41**, 155—160.
- 5) David HL, Sara HA and Gerald S : The effect of tumor necrosis factor- α and interferon- β on neutrophil function. J Surg Res (1989) **46**, 322—326.
- 6) Talmage JE, Phillips H and Schneider M : Immunomodulatory properties of recombinant murine and human tumor necrosis factor. Cancer Res (1988) **48**, 544—550.
- 7) Ostensen ME, Thiele DL and Lipsky PE : Tumor necrosis factor- α enhances cytolytic activity of human natural killer cells. J Immunol (1987) **138**, 4185—4191.
- 8) Fujii M, Takahashi N, Hayashi H, Yagihashi Y, Oguchi Y, Matsunaga K and Yoshikumi C : Purification and characterization of immunosuppressive (IS) substance obtained from ascitic fluids of colon cancer patients. Clin Biochem (1987) **20**, 183—189.
- 9) Fukuda S, Yamada Y, Kouguchi M, Ando S, Sato Y and Kurimoto M : Purification and characterization of natural human tumor necrosis factor from HVJ-stimulated BALL-1 cells. Chem Express (1987) **2**, 101—104.
- 10) Fukuda S, Ando S, Sanou O, Taniai M, Fujii M, Masaki N, Nakamura K, Ando O, Torigoe K, Sugimoto T and Kurimoto M : Simultaneous production of natural human tumor necrosis factor- α , - β

- and interferon- α from BALL-1 cells stimulated by HVJ. *Lymphokine Res* (1988) **7**, 175–185.
- 11) Ando S, Sanou O, Fujii M, Sato Y and Kurimoto M : Large scale production and characterization of natural human interferon- α from HVJ-stimulated BALL-1 cells. *Chem. Express* (1987) **2**, 45–48.
 - 12) Ando S, Ohta T, Tanimoto T, Sano O, Yamauchi H, Ando O, Torigoe K and Kurimoto M : Natural human interferon- γ derived from lipopolysaccharide-stimulated human myelomonocytic HBL-38 cells. *Jpn J Cancer Res (Gann)* (1988) **79**, 757–765.
 - 13) Eifel PJ, Walker SH and Lucas ZJ : Standardization of sensitive and rapid assay for lymphotoxin. *Cell Immunol* (1975) **15**, 208–221.
 - 14) Mancini G : Immunochemical quantitation of antigen by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* (1965) **2**, 235–254.
 - 15) 胃癌研究会編 : 胃癌取扱い規約. 改訂第11版, 金原出版, 東京 (1985).
 - 16) 大腸癌研究会編 : 大腸癌取扱い規約. 改訂第4版, 金原出版, 東京 (1985).
 - 17) Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, Bringman TS, Henzel WJ, Jarett JA, Leung DE, Moffat B, Svedersky LP, Palladino MA and Nedwin GE : Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumor necrosis activity. *Nature* (1984) **312**, 721–724.
 - 18) Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Aggarwal BB and Goeddel DV : Human tumor necrosis factor : precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* (1984) **312**, 724–739.
 - 19) Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht LP, Finkle SBS and Palladino MA : Letter to the editor. *J Immunol* (1986) **136**, 2335–2336.
 - 20) Bevilacqua MP, Pober JS and Maheau GR : Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci* (1986) **83**, 4533–4537.
 - 21) Nawroth PP and Stern DM : Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med* (1986) **163**, 740–749.
 - 22) David GH, Kevin JT and Yuman F : Cytokine appearance human endotoxemia and primate bacteraemia. *Surg Gynecol Obstet* (1988) **166**, 147–150.
 - 23) Beutler BA, Milsark IW and Cerami A : Cachectin/tumor necrosis factor : Production, distribution and metabolic fate in vivo. *J Immunol* (1985) **135**, 3972–3978.
 - 24) Kevin JT, Bruce B and Stephen FL : Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* (1986) **234**, 470–472.
 - 25) Hamada F, Fuchimoto S and Orita K : Suppression of lymphokine activated killer (LAK) cells by immunosuppressive substance. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* (1989) **65**, 81–95.
 - 26) 万波徹也, 淵本定儀, 雨宮慎二, 森岡 栄, 田中伸一郎, 田中紀章, 小長英二, 折田薫三 : 各種疾患における血清中免疫抑制物質 (IS 物質) の検討. *癌と化学療法* (1982) **9**, 2104–2112.
 - 27) 安井義政, 淵本定儀, 浜田史洋, 椎木滋雄, 岩垣博巳, 三宅三喜男, 前田徹也, 佐々木章公, 折田薫三 : Immunosuppressive substance (ISS) による NK 活性抑制系に及ぼす nHuIFN と nHuTNF の併用効果の検討. *BIO THERAPY* (1988) **2**, 71–74.
 - 28) Fischer A, Durandy A and Griscelli C : Role of prostaglandin E_2 in the induction of nonspecific T lymphocyte suppressor activity. *J Immunol* (1981) **126**, 1452–1455.
 - 29) Ting CC and Hargrove : Regulation of the activation of cytotoxic T lymphocytes by prostaglandins and antigens. *J Immunol* (1984) **133**, 660–666.
 - 30) 浜田史洋, 淵本定儀, 板野 聡, 木村隆信, 紙谷晋吾, 猶本良夫, 鮑浦良和, 田中紀章, 折田薫三 : 免疫抑制物質 (ISS) の LAK 細胞に及ぼす影響の検討. 第42回日本癌学会総会記事 (1983).

**Effect of immunosuppressive substance against
the potency of natural human tumor necrosis
factor as biological response modifier**

Yoshimasa YASUI

**First Department of Surgery,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan**

(Director : Prof. K. Orita)

TNF is a cytokine with the activity of a BRM (biological response modifier). TNF- α and TNF- β enhanced NK activity of peripheral blood mononucleocytes of a normal donor, but not in a cancer patient. ISS, a glycoprotein extracted from the ascitic fluid of a colon cancer patient with immunosuppressive properties, is also detected in large quantities in the serum of cancer patients. NK activity of a normal donor which was in an immunosuppressive state by the administration of ISS was not affected by treatment of TNF- α or TNF- β , but the suppressed NK activity was improved by the combination of TNF with IFN- α or IFN- γ . On the other hand, NK activity of a cancer patient treated with anti-IS antiserum which was obtained from serum of rabbit immunized by ISS was enhanced by both TNFs. These findings suggest that ISS suppresses the effect of TNFs on NK activity. Furthermore, the effect of TNF as a BRM is inhibited in cancer patients due to the high dose of ISS in the serum, and that the combination of TNF with other cytokines, such as IFN, is more effective than the single use of TNF, clinically.