

# 健常人および上部消化器癌患者における末梢血マ クロファージの interleukin $1\beta$ , tumor necrosis factor $\alpha$ , interleukin 6 産生能の検討

野口 淳

近畿大学医学部第2外科学教室

Studies on the production of interleukin  $1\beta$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ,  
interleukin 6 in peripheral macrophages obtained from healthy  
subjects and patients with cancer of the upper digestive tract

Jun Noguchi

Second Department of Surgery, Kinki University School of Medicine,  
Osaka, Japan

## ABSTRACT

The development of biotechnology has resulted in successful gene cloning of cytokines, and elucidation of the regulation of immunocompetent cells. However, the function of each cytokine on individuals with cancer remains unknown. Interleukin  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and interleukin 6 (IL-6) are mainly produced by a monocyte line. These three cytokines overlap with many functions. In this study, the *in vitro* IL- $1\beta$ , TNF $\alpha$  and IL-6 production stimulated with lipopolysaccharide (LPS) were examined in human macrophages (M $\phi$ ) obtained from healthy subjects and patients with cancer of the upper digestive tract (gastric and esophageal cancer) to elucidate the influence of these cytokines on the cancer patient. M $\phi$  were isolated from the peripheral blood using the Ficoll-Conray centrifugation technique and subsequently with the plastic disc adherence technique. They were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> air with or without LPS. IL- $1\beta$  and TNF $\alpha$  released into the culture fluid were measured by immunoradiometric assay (IRMA), and IL-6 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The production of these three cytokines were detectable within 4 hours of incubation, however, at 2 hours, only TNF $\alpha$  was detected in the culture supernatant obtained from healthy subjects and cancer patients, thus presumably affecting the production of IL- $1\beta$  and IL-6 in the culture. The *in vitro* producibility of IL- $1\beta$  by M $\phi$  was found to be significantly enhanced in patients with esophageal cancer and gastric cancer as compared with that in healthy subjects ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$ ). Similarly, the *in vitro* producibility of TNF $\alpha$  and IL-6 by M $\phi$  was also found to be significantly enhanced in patients with esophageal

cancer and gastric cancer as compared with that in healthy subjects ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.0005$ ), ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0005$ ).

A positive relationship among all three cytokines was recognized in the healthy subjects, while a positive correlation was recognized only between IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  in patients with gastric cancer. The production of IL-1 $\beta$  by M $\phi$  in gastric cancers was found to be significantly enhanced in patients with stages III and IV cancer as compared with that in patients with stages I and II cancer. The production of IL-1 $\beta$  in patients with ps(+) and ly(+) was significantly increased as compared with that in patients with ps(-) and ly(-) clinicopathological factors. The production of TNF $\alpha$  in patients with ps(+) significantly increased as compared with that in ps(-). These findings suggest that measurement of the production of three cytokines by M $\phi$  can be used to estimate the immunological status of patients with cancer.

**Key words :** interleukin 1 $\beta$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 6, macrophage, gastric cancer

## 緒 言

近年、バイオテクノロジーの進歩によりサイトカイン遺伝子のクローニングが精力的に行われ、免疫担当細胞の調節機構が明らかになりつつあるが、担癌状態における各種サイトカインの働きは、未だ十分解明されていない。主として単球系から産生されるものには Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、腫瘍壊死因子 (TNF $\alpha$ )、Interleukin 6 (IL-6) 等がある<sup>1-3</sup>。これら3者は多くの面でその機能が重複していると考えられている<sup>4</sup>。本研究ではこれら3者の生体に及ぼす広範多岐にわたる作用の中で、担癌生体との関与の一端を解明することを目的として、ヒト末梢血マクロファージ (M $\phi$ ) の lipopolysaccharide (LPS, Sigma) 刺激によるサイトカイン産生能に注目し、健常人、胃癌、食道癌患者における *in vitro* での IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 産生能について基礎的および臨床的検討を行った。

## 研究対象および方法

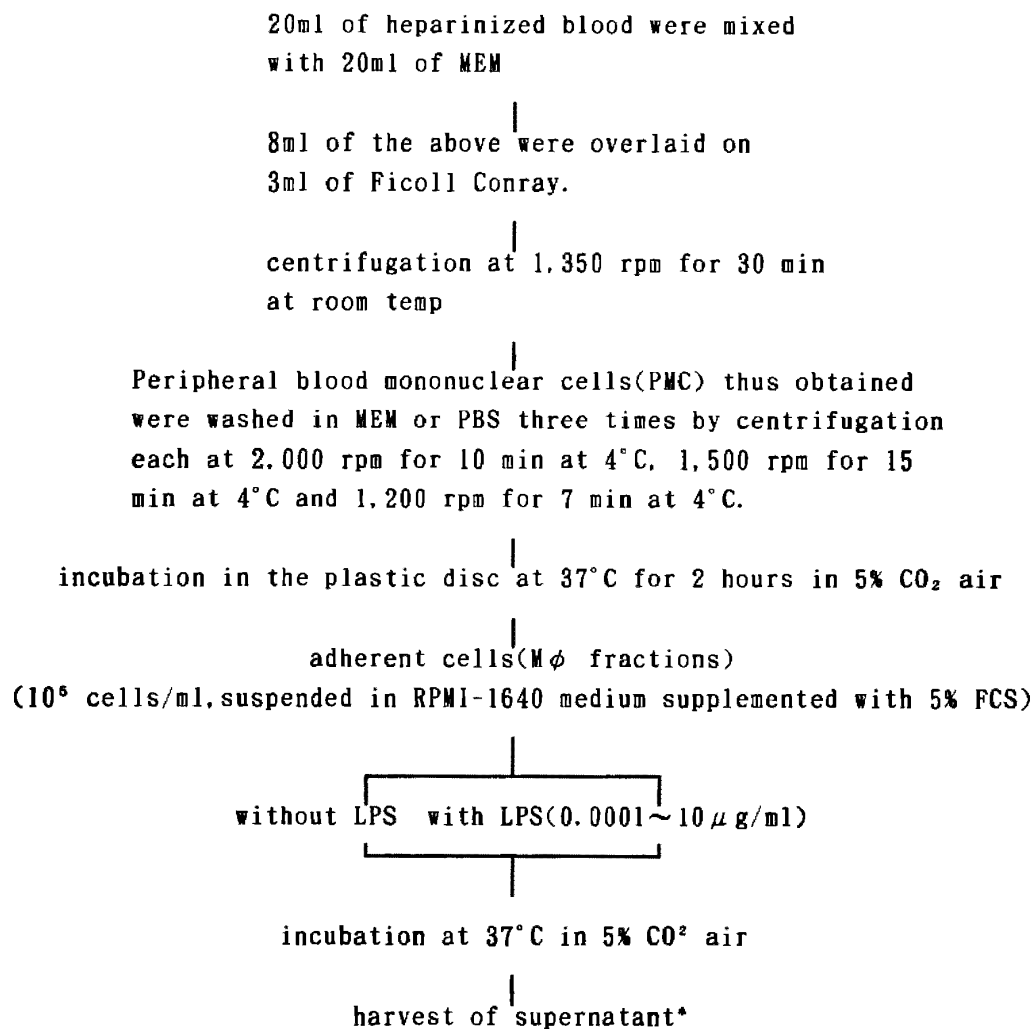
### 1. 症例

1988年4月から1991年9月までに近畿大学医学部附属病院第2外科に入院し研究の主旨を説明し承諾を得た胃癌患者17例 (男9名, 女8名, 42~76歳, 平均63 $\pm$ 9歳 (mean $\pm$ SD)),

食道癌患者7例 (男6名, 女1名, 53~71歳, 平均60 $\pm$ 6歳) を対象とした。対照は同様に研究の主旨を説明し承諾を得た特定の疾患を持たない健常人16例 (男9名, 女7名, 26~83歳, 平均41 $\pm$ 19歳) とした。

### 2. 方法

Figure 1 に M $\phi$  の分離および培養の概略を示す。早朝空腹時、健常人、担癌患者の末梢血 20 ml をヘパリン採血した後、20 ml の Eagle の minimum essential medium (MEM, 阪大微研) を混ぜ、Ficoll-Conray 比重遠沈法 (Ficoll-Paque, Pharmacia) で型通り peripheral mononuclear cells (PMCs) を分離した<sup>5</sup>。これを 20 ml の phosphate buffered saline (PBS, 阪大微研) で2回、MEM で1回洗浄した後、5% fetal calf serum (FCS, Gibco) 添加 RPMI-1640 培養液 (阪大微研) に浮遊し、37°C 5% CO<sub>2</sub> の条件でプラスチックシャーレ (Nunc 150350) に2時間吸着させて adherent cells すなわち M $\phi$  分画 (M $\phi$  fractions) を分離した<sup>6,7</sup>。この M $\phi$  分画の細胞構成はエラスターゼ陽性細胞78%, CD 14 陽性細胞84%以上であった。培養開始時、5% FCS 添加 RPMI-1640 培地中に M $\phi$  を 10<sup>5</sup> cells/ml に浮遊調整した。まず、各サイトカイン、IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 産生の time course と LPS 刺激による容量依存性を検討するため

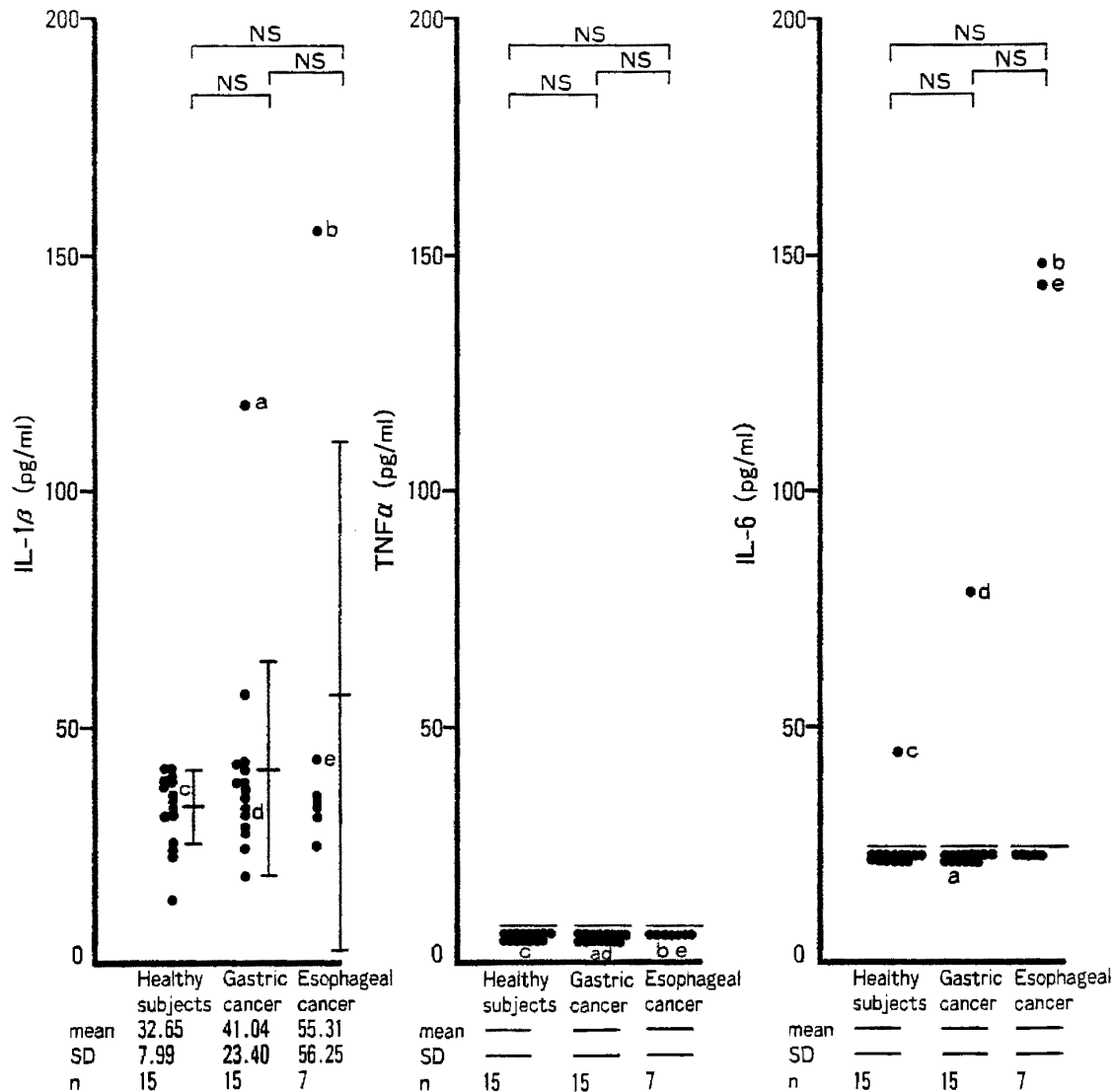


**Fig. 1** Methods of culture of peripheral macrophage fractions Supernatant\* was harvested at hour 2,4,8,12,24,48 and used as sample for IL-1β, TNF α and IL-6 assay. FCS: fetal calf serum, LPS: lipopolysaccharide, MEM: minimum essential medium, PBS: phosphate buffered saline

に, 健常人 5 名, 未治療胃癌患者 5 名について LPS 非刺激および LPS 0.0001~10 μg/ml の濃度間を 6 段階に分け (LPS を RPMI-1640 に溶解し各濃度に調整), 各濃度別に LPS 刺激をし, 37°C 5% CO<sub>2</sub> の条件で Mφ の培養を行った後, 2 時間, 4 時間, 8 時間, 12 時間, 24 時間, 48 時間で経時的に培養上清を採取した. なお, time course と LPS 刺激による容量依存性を検討した結果, 以後の Mφ の培養条件は, 12 時間培養, LPS 1 μg/ml 刺激とした.

以上の方法で得た培養上清中の IL-1β, TNFα を immunoradiometric assay (IRMA) 法 (Medgenix IL-1β, TNFα RIA kit 使用),

IL-6 を enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法 (Genzyme INTERTEST-6 ELISA kit 使用) で測定した. また, 胃癌患者では未治療時以外に, 術前 1 週間と術後 2 週間で IL-1β, TNFα, IL-6 産生能を測定した. 併せて健常人および担癌患者血漿中の 3 者サイトカインの測定も同様に行ったが, この場合, 血漿中サイトカイン量の再現性を保つため, 採血時トラジロール加 EDTA-2Na 試験管を用いた<sup>8</sup>. 胃癌患者における組織学的進行度, 臨床病理学的所見による検討は以下に示す胃癌取扱規約, (11版)<sup>9</sup> により, ps: 予後的漿膜面因子, ly: 胃壁内リンパ管への癌細胞侵襲, v: 胃壁内静脈への癌細胞侵襲, n: リンパ節転移について



**Fig. 2** Plasma levels of IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IL-6 in healthy subjects, patients with gastric cancer and patients with esophageal cancer  
Data are shown as the mean $\pm$ SD. Each point a, b, c, d and e shows the results obtained on the same subject. NS: not significant

行った。

数値の統計学的検定は、Student's t-test により行った。

## 結 果

### (1) 血漿中 IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 値について

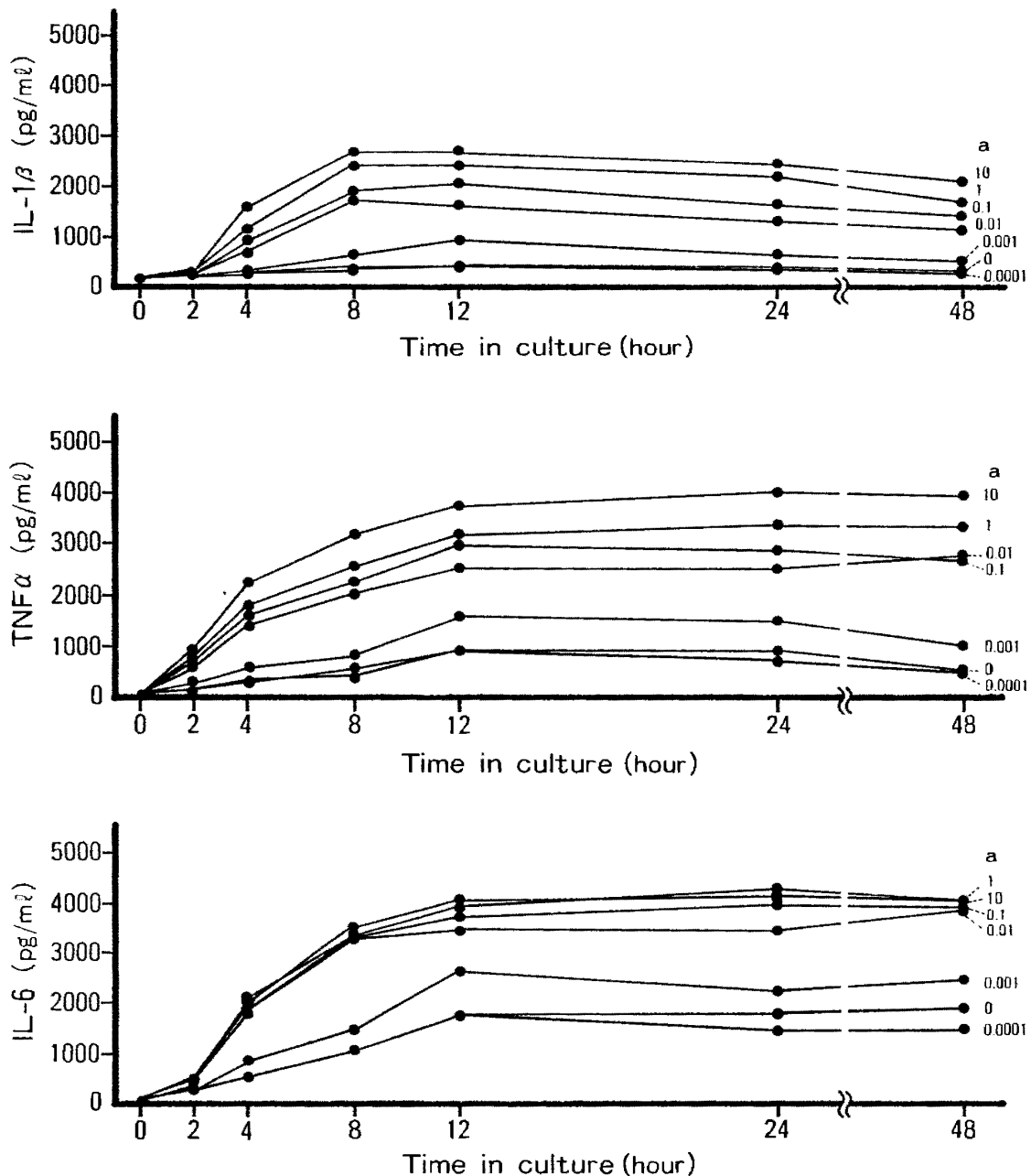
培養に先だって、健常人、担癌患者血漿中の IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 値の測定を行った (Fig. 2)。IL-1 $\beta$  は 2 例の 100~150 pg/ml の値を除いて、ほとんどが 20~50 pg/ml の範囲内に分布を示した。

一方、TNF $\alpha$  はすべて感度以下 (8 pg/ml)

であり、IL-6 は 3 例の 50~150 pg/ml の値を示した以外、大部分の検体は感度以下 (25 pg/ml) であった。また、IL-1 $\beta$ , IL-6 高値の検体について、各サイトカイン間での明らかな相関性は認められず、stage 等との相関も認められなかった。そして 3 者サイトカインとも健常人、担癌患者の間に統計学的有意差を認めなかった。

### (2) 培養時間と IL-1 $\beta$ 産生能

Figure 3 上段に担癌患者 M $\phi$  における LPS 各濃度での IL-1 $\beta$  産生の time course を示した。培養開始後 4 時間で M $\phi$  による IL-1 $\beta$  産生が認められ、8~12 時間ではほぼ産生のピー



**Fig. 3** Time course of LPS-induced production of IL-1β, TNFα and IL-6 in cultures of macrophages obtained from patients with gastric cancer  
Data are shown as the mean value of 5 experiments.  
a: LPS concentration in culture (μg/ml)

クを示し, その後は減少傾向を示した.

(3) 培養時間と TNFα 産生能

Figure 3 中段に上記と同様に TNFα 産生の time course を示した. 培養開始後 2 時間で Mφ による TNFα 産生が認められ, 12~24 時間で産生のピークを示し, その後はプラトーもしくはやや減少を示した.

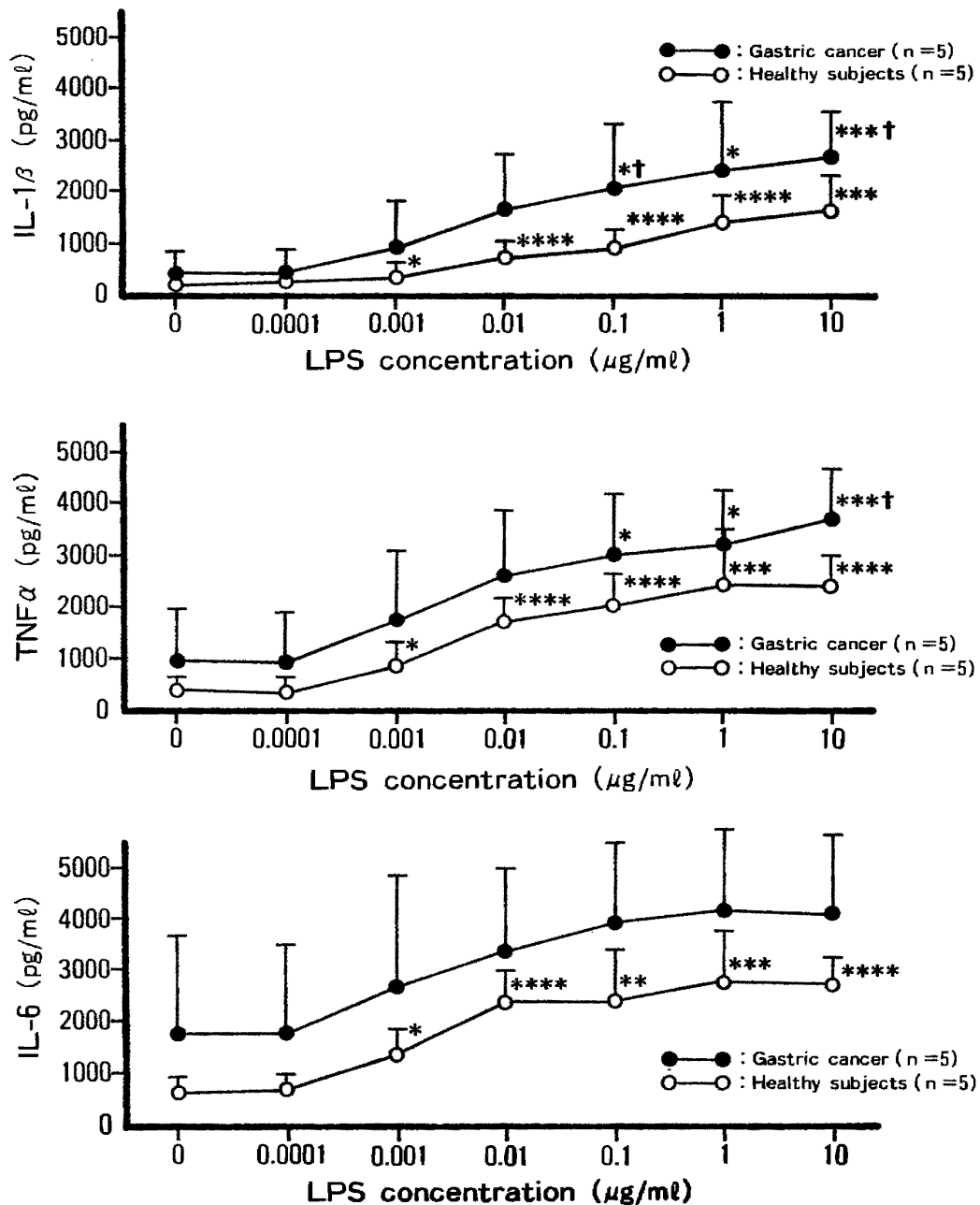
(4) 培養時間と IL-6 産生能

Figure 3 下段に上記と同様に IL-6 産生の

time course を示した. 培養開始後 4 時間で Mφ による IL-6 産生が認められ, 12~24 時間で産生のピークを示し, その後はプラトーもしくは減少を示した.

(5) LPS 濃度と IL-1β, TNFα, IL-6 産生能

LPS 濃度の IL-1β, TNFα, IL-6 各サイトカイン産生に及ぼす影響をみるために, 健常人および担癌患者において LPS 非刺激, LPS



**Fig. 4** Dose-dependency of LPS-induced production of IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IL-6 in cultures of macrophages obtained from healthy subjects and patients with gastric cancer. Data are shown as the mean+SD. Incubation was performed at 37°C for 12 hours. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.005, \*\*\*\* $p$ <0.0001, as compared to the control containing no LPS,  $\dagger p$ <0.05, as compared to healthy subjects.

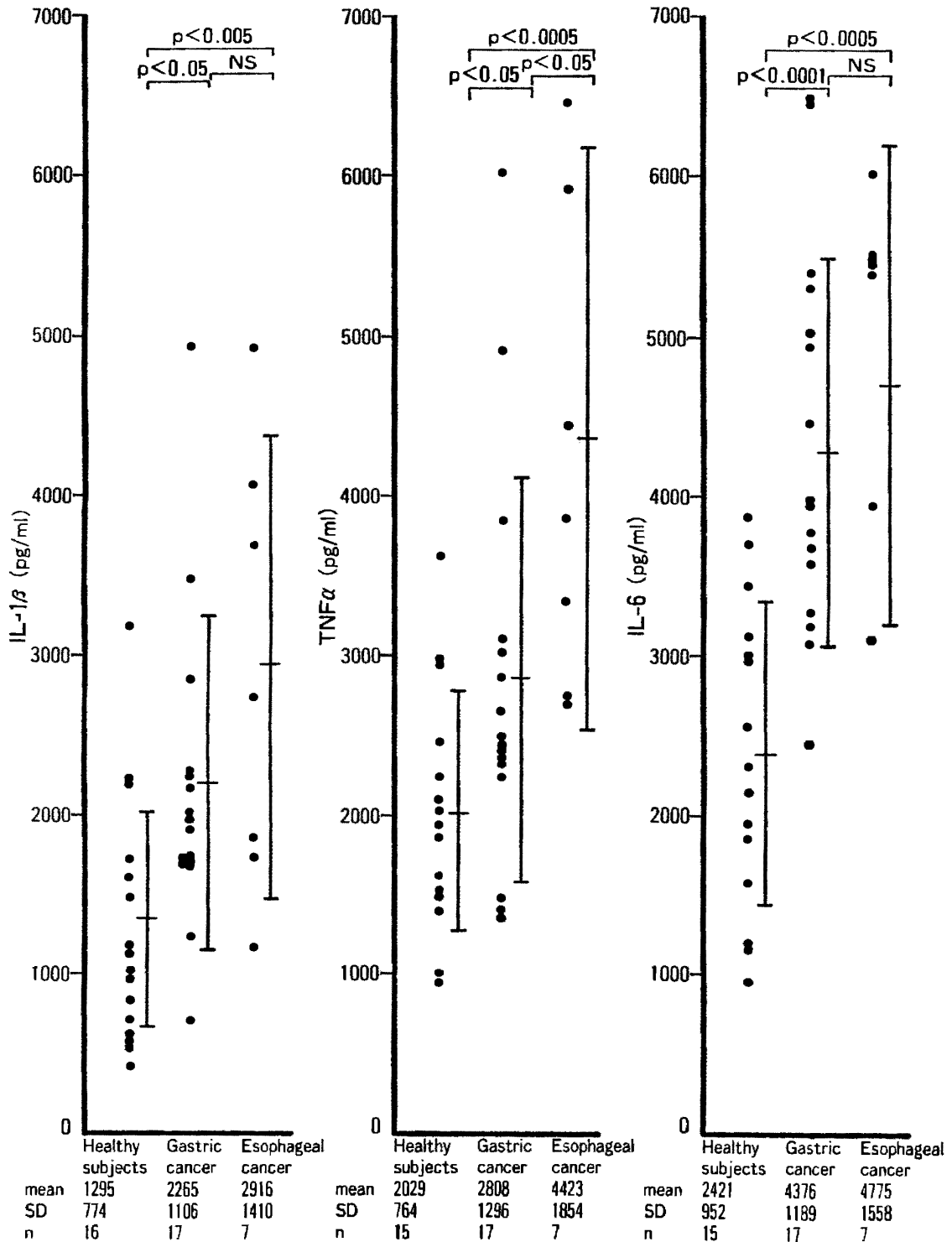
0.0001~10  $\mu$ g/ml の細分化した範囲で M $\phi$  の刺激を行い、培養開始後12時間での各サイトカイン産生を測定した。Figure 4 に示したように、健常人、担癌患者共に LPS 0.0001~1 $\mu$ g/ml にかけて IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 産生の容量依存性が認められた。さらに、1 $\mu$ g/ml の LPS 濃度で両群共 LPS 高濃度刺激時 (LPS :

10  $\mu$ g/ml) の産生量にほぼ近い値を示した。

(2)(3)(4)(5)の結果から、以下の IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 産生能の検討は培養開始後12時間、LPS 刺激濃度 1 $\mu$ g/ml の統一条件で行った。

(6) 健常人と担癌患者との IL-1 $\beta$  産生能の比較

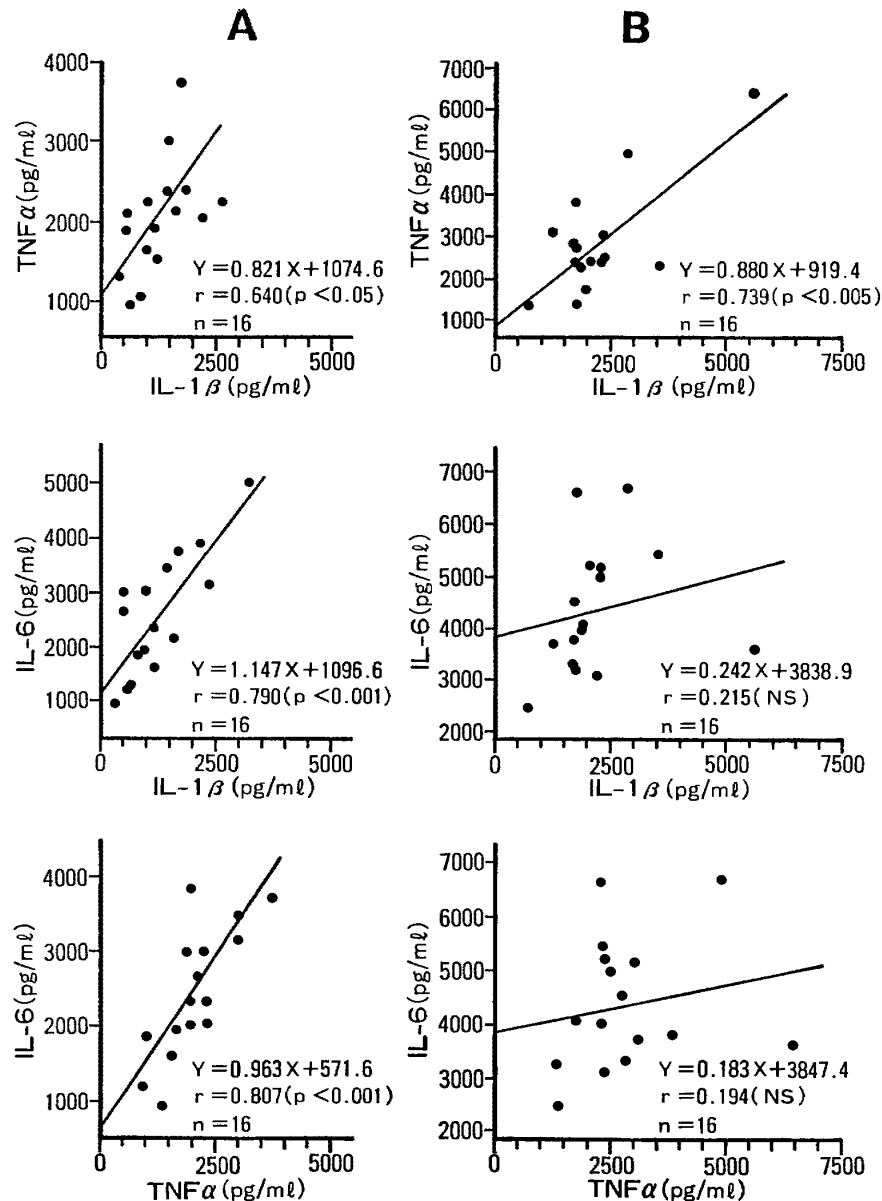
健常人 および 術前未治療の胃癌、食道癌患



**Fig. 5** LPS-induced production of IL-1β, TNFα and IL-6 in cultures of macrophages obtained from healthy subjects, patients with gastric cancer and patients with esophageal cancer. Data are shown as the mean±SD. Incubation was performed at 37°C for 12 hours in the presence of LPS (1.0μg/ml). NS: not significant

者の Mφ における IL-1β 産生能の比較を Figure 5 に示した。各群の IL-1β 産生は健常人 1,295±774 pg/ml (mean±SD), 胃癌患者 2,265±1,106 pg/ml, 食道癌患者 2,916±

1,410 pg/ml であり，胃癌および食道癌患者 Mφ の IL-1β 産生能は健常人 Mφ のそれに比し，それぞれ有意の増強が認められた ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$ )。胃癌，食道癌患者の間には



**Fig. 6** Relationship among LPS-induced production of IL-1  $\beta$ , TNF  $\alpha$  and IL-6 in cultures from macrophages obtained from healthy subjects(A) and patients with gastric cancer(B)

有意差は認められなかった。

(7) 健常人と担癌患者との TNF $\alpha$  産生能の比較

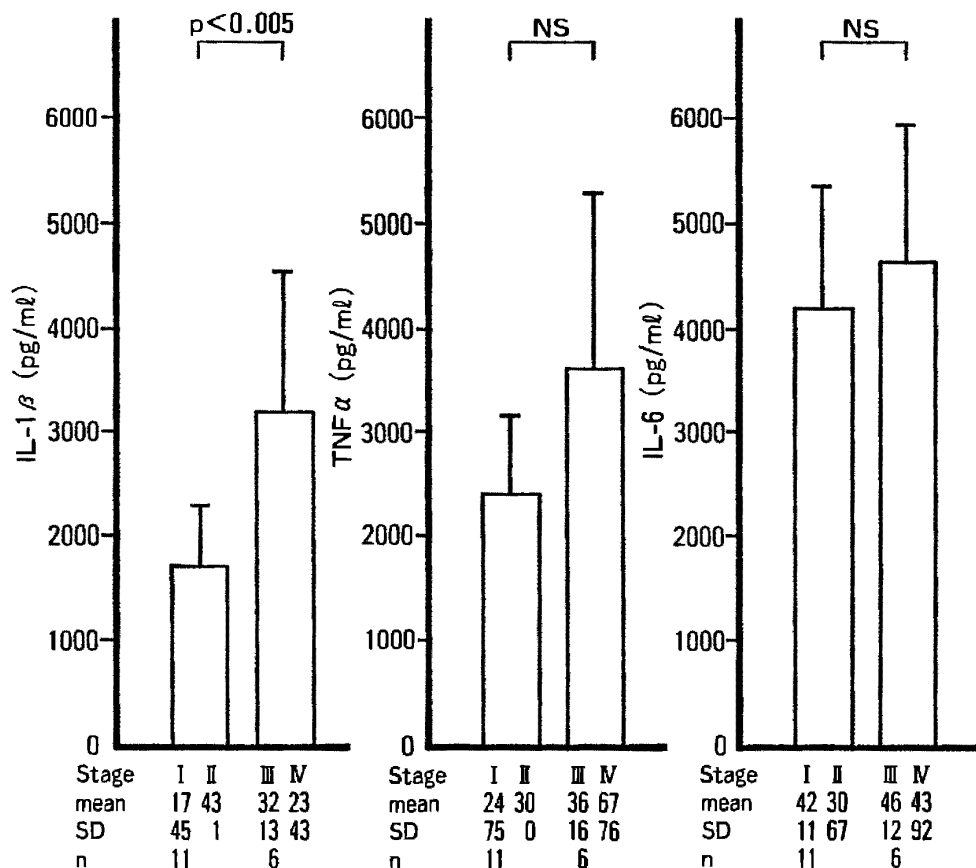
上記と同様に、健常人および術前未治療時の胃癌、食道癌患者の M $\phi$  における TNF $\alpha$  産生能の比較を Figure 5 に示した。各群の TNF $\alpha$  産生は健常人  $2,029 \pm 764$  pg/ml (mean  $\pm$  SD), 胃癌患者  $2,808 \pm 1,296$  pg/ml, 食道癌患者  $4,423 \pm 1,854$  pg/ml であり、胃癌および食道癌患者 M $\phi$  の TNF $\alpha$  産生能は健常人 M $\phi$  のそれに比し、それぞれ有意の増強が認め

られた ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.0005$ )。また、食道癌患者 M $\phi$  の TNF $\alpha$  産生能は胃癌患者に比し  $p < 0.05$  で有意の増強を認めた。

(8) 健常人と担癌患者との IL-6 産生能の比較

同様に、健常人および術前未治療の胃癌、食道癌患者の M $\phi$  における IL-6 産生能の比較を Figure 5 に示した。各群の IL-6 産生は健常人  $2,421 \pm 952$  pg/ml (mean  $\pm$  SD), 胃癌患者  $4,376 \pm 1,189$  pg/ml, 食道癌患者  $4,775 \pm 1,558$  pg/ml であり、胃癌および食道癌患者





**Fig. 7** Comparison of LPS-induced production of cytokines in macrophages obtained from patients with gastric cancer by histological stage  
Data are shown as the mean+SD. Incubation was performed at 37°C for 12 hours in the presence of LPS(1.0μg/ml). NS: not significant

Mφ の IL-6 産生能は健常人 Mφ のそれに比し，それぞれ有意の増強が認められた (p < 0.0001, p < 0.0005)。なお，IL-1β と同様，胃癌，食道癌患者の間には有意差は認められなかった。

(9) 健常人，胃癌患者における三者サイトカイン産生能の相関関係

Figure 6 に健常人および胃癌患者における3者サイトカイン産生能，それぞれの相関関係を示した。健常人においては IL-1β と TNFα, IL-1β と IL-6, TNFα と IL-6 いずれにおいても有意の正の相関関係が認められた (p < 0.05, p < 0.001, p < 0.001)。胃癌患者においては IL-1β と TNFα のみ有意の相関関係が認められ (p < 0.005), IL-1β と IL-6, TNFα と IL-6 については相関関係は認められなかった。

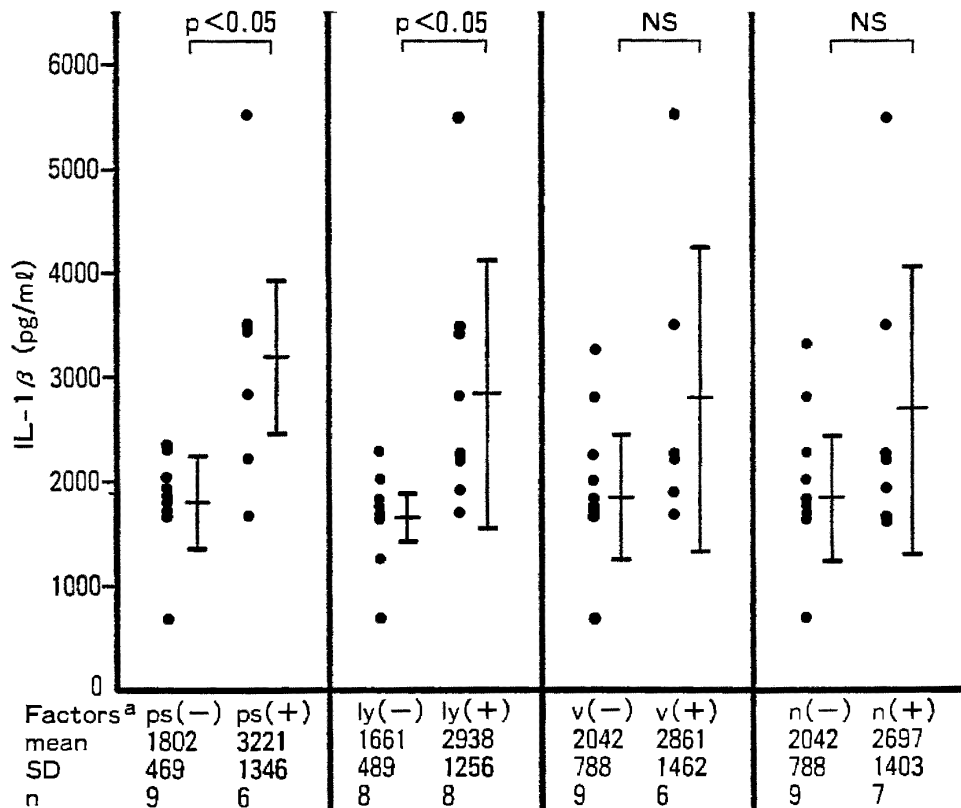
(10) 組織学的進行度と IL-1β, TNFα, IL-6

産生能

胃癌症例の stage I, II 群, III, IV 群別による3者サイトカインの産生能を Figure 7 に示した。まず IL-β において stage I, II 群に比し，stage III, IV 群は p < 0.005 で有意の産生増強を認めた。TNFα, IL-6 においては stage I, II 群に比し stage III, IV 群に2者サイトカイン産生増強の傾向はあるものの両群に統計学的有意差は認められなかった。

(11) 臨床病理学的所見と IL-1β, TNFα, IL-6 産生能

胃癌疾患研究会による胃癌取扱規約<sup>9</sup> に基づいた病理組織学的因子と IL-1β, TNFα, IL-6 産生能との関係を検討した (Figs. 8-10)。まず，胃壁内リンパ管への癌細胞侵襲の有無を示す ly(+), ly(-) で検討すると IL-1β は ly(+ ) 症例が ly(-) 症例に比し p < 0.05 で有意の増強を認めた。しかし，IL-6, TNFα に



**Fig. 8** Relationship between LPS-induced IL-1 $\beta$  production in macrophages and clinicopathological factors<sup>a</sup> in patients with gastric cancer

Data are shown as the mean  $\pm$  SD. The incubation was performed at 37°C for 12 hours in the presence of LPS (1.0  $\mu$ g/ml). <sup>a</sup>Classification of the factors is based on the guidelines for clinical and pathologic studies on gastric cancer published by Japanese Research Society for Gastric Cancer<sup>9</sup>. \*NS: not significant, ly(+): with lymphatic invasion, ly(-): without lymphatic invasion, n(+): with lymph node metastasis, n(-): without lymph node metastasis, ps: prognostic factor of serosa, ps(+): depth of invasion from ss $\gamma$  to serosa, ps(-): depth of invasion from mucosa to ss $\beta$ , v(+): with blood vessel invasion, v(-): without blood vessel invasion

においては両者間に有意差は認められなかった。次に胃壁内静脈への癌細胞の侵襲の有無を示す v(+), v(-) で検討すると 3 者サイトカインとも両者間に差異は認められなかった。リンパ節転移 n(+), n(-) においても 3 者とも両者間に差異は認められなかった。そして予後的漿膜面因子陽性 ps(+), 同陰性 ps(-) で 3 者サイトカインを比較すると IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  において ps(+) が ps(-) に比し  $p < 0.05$  で有意の増強を認めた。一方, IL-6 においては両者間に差異は認められなかった。

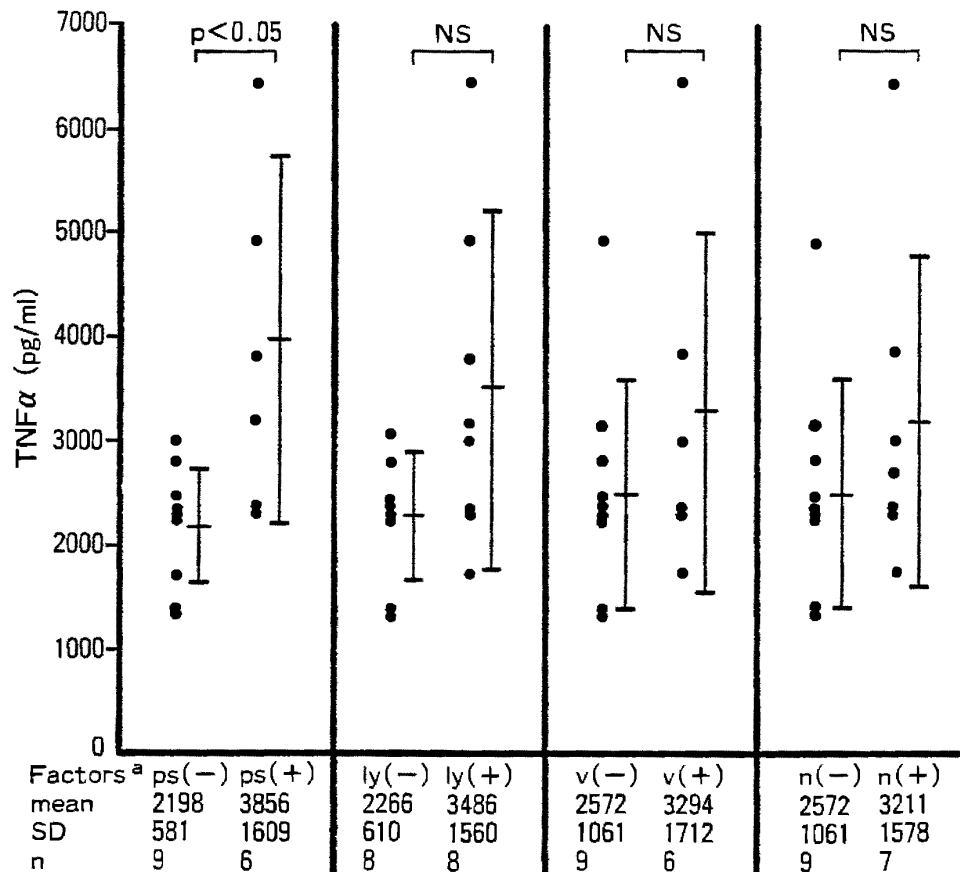
(2) 手術の IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 産生能に及ぼす影響

Table 1 に個々の患者のデータ, Figure 11

に胃癌患者の術前 1 週間, 術後 2 週間における M $\phi$  の 3 者サイトカイン産生能の比較を示した。術式はすべて胃亜全摘術によった。3 者サイトカインとも, 術前, 術後 2 週間において統計学的有意差は認められなかった。

## 考 察

担癌生体における抗腫瘍免疫応答は, T 細胞, B 細胞, M $\phi$ , NK 細胞や多核白血球などの種々の細胞, および各種サイトカインの相互作用によりなされている<sup>10</sup>。そして担癌状態においては免疫応答とくに細胞性免疫能は一般に低下状態にあるといわれており<sup>11,12</sup>, たとえば, 青木ら<sup>13</sup> は甲状腺癌, 松本<sup>14</sup> は食道癌患者にお



**Fig. 9** Relationship between LPS-induced TNF $\alpha$  production in macrophages and clinicopathological factors<sup>a</sup> in patients with gastric cancer

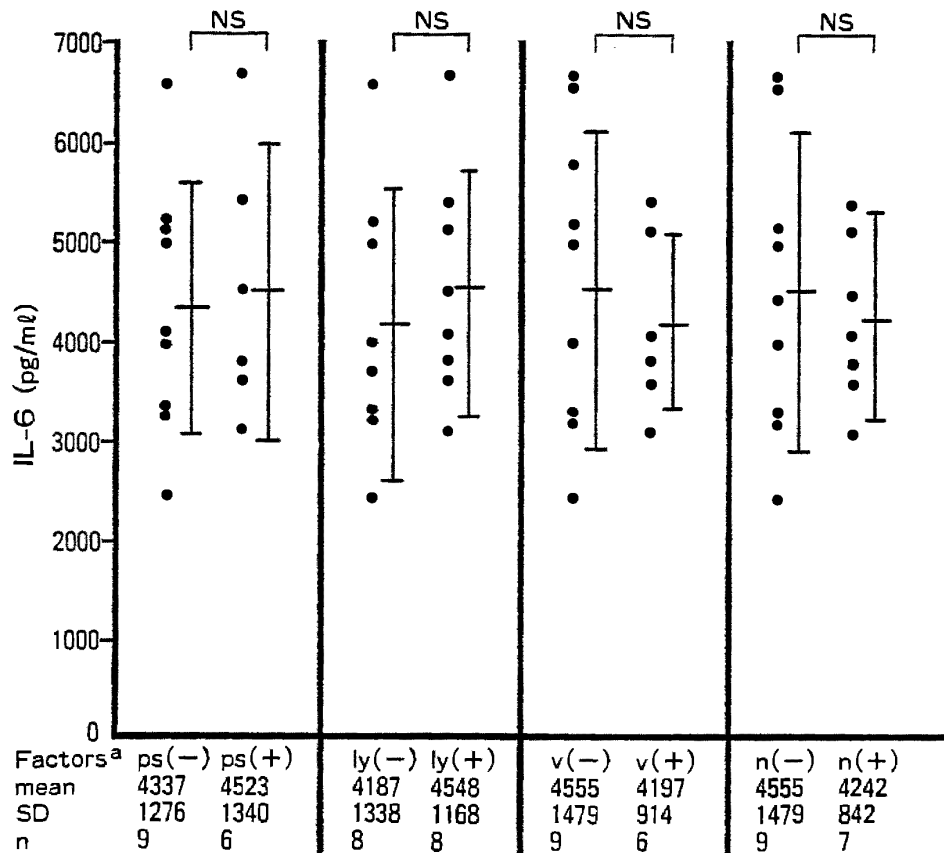
Data are shown as the mean $\pm$ SD. Incubation was performed at 37°C for 12 hours in the presence of LPS(1.0 $\mu$ g/ml). <sup>a</sup>Classification of the factors is based on the guidelines for clinical and pathologic studies on gastric cancer published by Japanese Research Society for Gastric Cancer<sup>9</sup>.

NS, ly(+), ly(-), n(+), n(-), ps, ps(+), ps(-), v(+), v(-): same as above\*

**Table 1** Clinical findings of patients used for comparative studies of the cytokine production before and after surgery

Patient Age/Sex	Histology	WBC (cells/ $\mu$ l)		Lymphocyte (cells/ $\mu$ l)		Body temp. (°C)	
		before <sup>b</sup>	after <sup>a</sup>	before	after	before	after
60/M	well dif.	8,000	6,700	2,000	2,010	35.7	36.4
53/M	poorly dif.	5,400	8,200	—	1,640	36.4	36.8
68/M	well dif.	3,800	7,900	1,520	720	36.2	36.8
56/F	moderately dif.	3,900	4,700	1,755	1,058	36.5	36.8
72/F	poorly dif.	5,000	4,000	2,350	1,880	35.8	36.2
51/M	well dif.	—	—	—	—	36.2	36.7
42/M	mucinous	5,300	4,500	1,616	1,835	36.7	36.6
57/M	well dif.	3,700	4,000	1,540	1,600	36.0	36.2
48/M	well dif.	4,200	3,900	1,600	1,540	36.5	36.3
66/F	well dif.	—	5,100	—	2,397	35.6	36.2

The assay was performed 7 days before operation and 14 days after operation. <sup>a</sup>:after operation, <sup>b</sup>:before operation, dif.: differentiated, F: female, M: men, Body temp.: body temperature, WBC: white blood cell, —: no data



**Fig. 10** Relationship between LPS-induced IL-6 production in macrophages and clinicopathological factors<sup>a</sup> in patients with gastric cancer

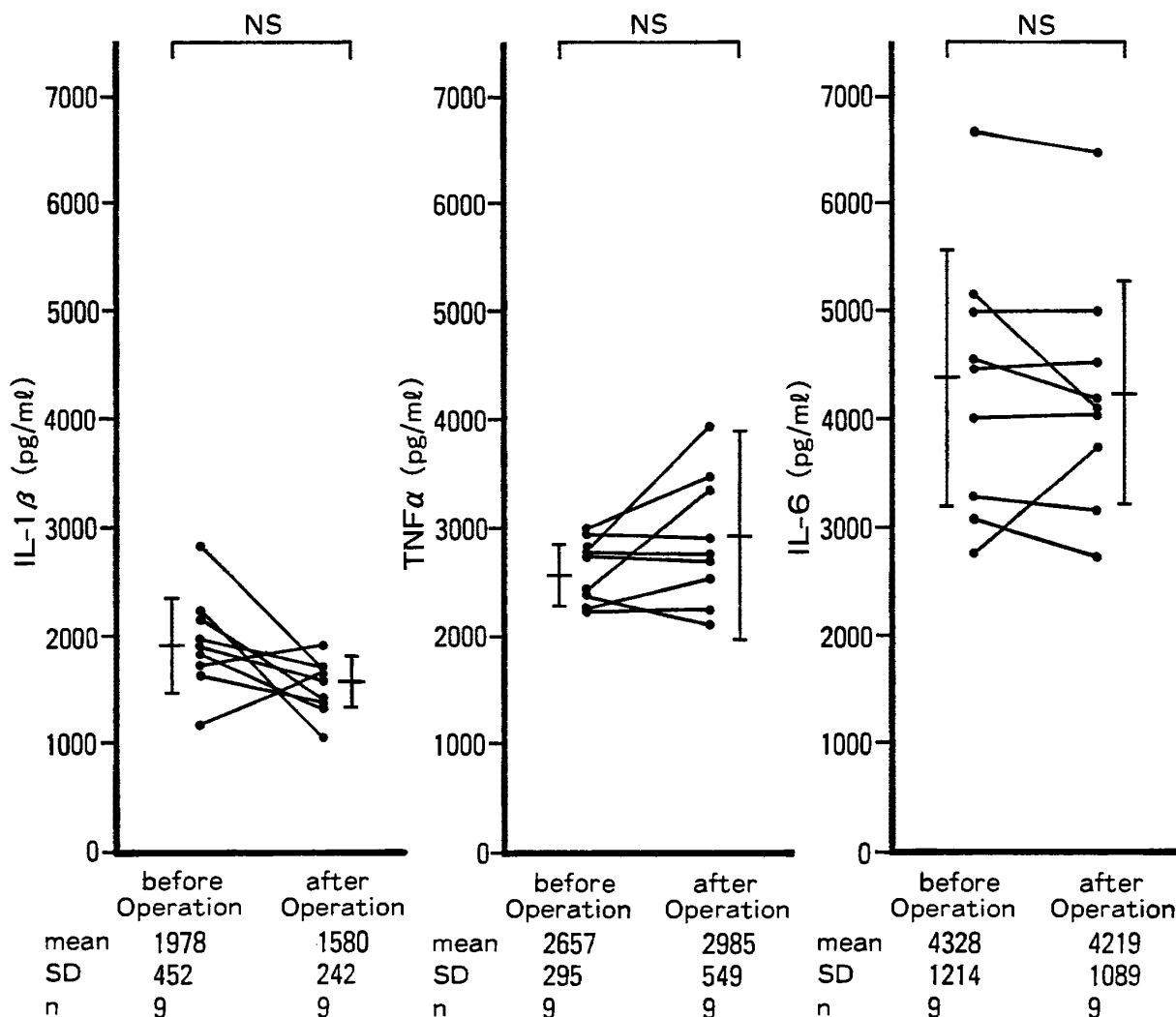
Data are shown as the mean $\pm$ SD. The incubation was performed at 37°C for 12 hours in the presence of LPS(1.0 $\mu$ g/ml). <sup>a</sup>Classification of the factors is based on the guidelines for clinical and pathologic studies on gastric cancer published by Japanese Research Society for Gastric Cancer<sup>9</sup>.

NS, ly(+), ly(-), n(+), n(-), ps, ps(+), ps(-), v(+), v(-): same as above\*

ける NK 活性の低下について報告し、泉谷<sup>15</sup>は食道癌、胃癌患者における末梢血単核球の IFN- $\gamma$  産生能の低下について報告している。また、寺田<sup>6</sup>は免疫抑制性に働く PGE<sub>2</sub> について食道癌、胃癌患者の M $\phi$  においてその産生能の増強を報告した。

今日の免疫系のネットワークはサイトカインネットワークそのものと考えて過言ではない。本研究では、そのネットワークの重要なメディエーターである IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  および IL-6 に注目してヒト末梢血 M $\phi$  の3者サイトカイン産生能を測定し、それらの消化器癌患者での基礎的および臨床的意義について検討した。IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 の3者サイトカインはいずれも主として M $\phi$  により産生されるサイ

トカインであり、その作用において抗腫瘍作用、炎症および抗体産生など多くの面で機能が重複している<sup>16-18</sup>。また、各サイトカイン間には相互依存性が存在し、サイトカインネットワークの一端を形成している<sup>19,20</sup>。IL-1 は Gery ら<sup>21</sup>によりリンパ球活性化因子として発見されたが、その後 M $\phi$ , 単球系細胞、および B 細胞、線維芽細胞、ケラチノ細胞、血管内皮細胞、好中球など種々の細胞からも産生されることが判明している。その作用はさまざまな生物活性を示し、免疫、炎症、造血、内分泌、脳神経などの生体反応に重要な役割を果たしている<sup>22,23</sup>。IL-1 はその等電点 (pI) の違いにより IL-1 $\alpha$  (pI 5) と IL-1 $\beta$  (pI 7) の2つのタイプに分けられ<sup>16</sup>、生物学的活性の質的な差異は



**Fig. 11** Comparison of LPS-induced production of IL-1β, TNFα and IL-6 in cultures of macrophages obtained from patients with gastric cancer before and after operation. Data are shown as the mean±SD(n=10). Incubation was performed at 37°C for 12 hours in the presence of LPS(1.0μg/ml). NS: not significant

現在のところ認められていないが, Mφ由来のIL-1はβ型が優勢であるとされている<sup>24</sup>. IL-6はB細胞の抗体産生細胞への最終段階の分化を誘導する因子として報告されてきた<sup>25</sup>. IL-6の産生細胞もさまざま, Mφ, T細胞, B細胞の免疫細胞をはじめ, 線維芽細胞, 血管内皮細胞, 膵β細胞など多種多彩である<sup>17</sup>. その作用は, 抗体産生<sup>26</sup>, IL-2産生の誘導<sup>27</sup>, T細胞の増殖<sup>28</sup>, キラー細胞の分化誘導<sup>29</sup>, 急性期蛋白合成の誘導<sup>30</sup>などさまざまである. TNFαは腫瘍に壊死を惹起する物質として発見され<sup>31,32</sup> その作用は腫瘍細胞に対する直接作用<sup>33</sup>, Mφ<sup>34</sup>, NK細胞<sup>35</sup>, 好中球<sup>36</sup>などの活性化, 急性

期蛋白合成の調節<sup>37</sup>, など多岐にわたり, MφおよびT細胞, 線維芽細胞等種々の細胞から産生される<sup>38,39</sup>. 今回Mφの培養実験に先立ち, まず血漿中のIL-1β, TNFα, IL-6値を測定した. IL-1β値において担癌患者2例に100pg/ml程度の値を示すものがあったが健常人と担癌患者の間に統計学的有意差は認められなかった. TNFα, IL-6においては健常人, 担癌患者とも測定感度以下のものが大半を占め両群に統計学的有意差は認められなかった. 通常ホルモンが血中を循環し遠隔の標的臓器に働くとは異なり, サイトカインは産生局所において, 近傍の標的細胞あるいは標的組織の細胞表

面にある特異的レセプターと結合することによって活性を発揮する<sup>40</sup> ということを考慮すると、今回の血漿中における各サイトカイン値の測定結果に大差がなかったことは理解できるものである。そこでサイトカインの持つこのような特殊性を考慮し、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  および IL-6 の主たる産生細胞である M $\phi$  に着目した。in vitro において LPS 刺激で M $\phi$  を培養することにより 担癌患者の細胞性免疫能と M $\phi$  による 3 者サイトカイン産生能との関係がより明確になると考えた。

M $\phi$  の強力な刺激物質である LPS を用いることにより末梢血 M $\phi$  培養上清における IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、および IL-6 産生の time course と容量依存性を検討した。Fidler ら<sup>41</sup> は IL-1 については培養開始後 2~3 時間で TNF については 3 時間で産生を認めたと報告している。Hirose ら<sup>42</sup> は蛋白結合ポリサッカライドである PSK による peripheral blood mononuclear cells (PBMC) 刺激で、培養開始後 3 時間で IL-6 産生を認めており、諸家の報告もこの 3 者サイトカインの培養上清中の検出は 2~3 時間としている。本研究において、培養早期の担癌患者における 3 者サイトカインの kinetics は、3 者とも 4 時間までにその産生を認めたが、TNF $\alpha$  は IL-1 $\beta$ 、IL-6 に先立ち既に 2 時間で産生を認めた。Van Dame ら<sup>43</sup> は IL-1 $\beta$  が TNF $\alpha$ 、IL-6 産生を刺激することを、また Locksley ら<sup>44</sup> は TNF $\alpha$  が IL-1 $\beta$  産生を刺激することを報告している。この様にサイトカイン間には相互依存性が存在し複雑なサイトカインネットワークを形成していることが考えられる<sup>45</sup>。著者の実験系では IL-1 $\beta$ 、IL-6 の kinetics をみるとそれらの産生開始に差がなかった。このことは本実験系において培養初期のこれら両者の相互作用は明確ではなく、初期における両者の産生の kinetics は LPS の直接作用によるところが大きいと思われた。しかし、両者の産生ピークを検討すると IL-1 $\beta$  は IL-6 に先行し IL-1 $\beta$  の IL-6 に対する影響が示唆された。一方、TNF $\alpha$  は 3 者サイトカ

インのうち最も早く産生され、しかもそのピークが最も遅く認められたことはこの培養系において TNF $\alpha$  が IL-1 $\beta$ 、IL-6 産生に影響を与えていることを示唆した。健常人については既報のごとく<sup>46</sup>、それらサイトカイン産生の kinetics は担癌患者と同様、IL-1 $\beta$ 、IL-6 は培養開始後 4 時間で、TNF $\alpha$  は 2 時間でその産生を認めた。さらに、これらの time course と容量依存性に基づいて各サイトカイン産生能の比較を行った結果、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  そして IL-6 いずれにおいても、胃癌、食道癌患者は健常人に比し、それぞれ有意の増強を認めた (Fig. 5)。

担癌生体にみられる免疫能の低下は、よく知られた事実であるが、その一因に担癌血清の関与が報告されている。つまり担癌血清には、各種 effector cell に対する特異的および非特異的抑制物質が混在し、血清として免疫抑制作用を示すことが多いとされている<sup>47</sup>。たとえば immunosuppressive acidic protein (IAP) は分子量 50,000 の酸性糖蛋白であるが、これはリンパ球幼若化反応、マウス脾細胞の羊赤血球に対する抗体産生を抑制し、また M $\phi$  の機能低下をきたすとされている<sup>47</sup>。著者の in vitro の実験系においては、M $\phi$  分画を分離することにより in vivo つまり担癌血清中に存在する種々の免疫抑制物質が除かれ、その抑制効果が一時的に解除された結果、担癌患者 M $\phi$  の持つ本来の機能が十分にあらわれ、その結果、3 者サイトカインの産生増強をきたしたと考えられる。

生体にはホメオスターシスの機構があり、外的、内的環境の変化に応じて、生体および体細胞の形態、機能のある範囲の完全な状態に保持している。この生体のホメオスターシスを維持することを目的として神経系、内分泌系そして免疫系などの調節系が作動している<sup>48</sup>。癌の進行した状態いわゆる癌悪液質においては、その免疫系のホメオスターシスが失調した状態といわれており、サイトカインである IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  などの異常産生がその本体であろうと

いわれている<sup>48</sup>。本実験において認められた担癌患者 Mφ の3者サイトカインの産生能亢進はその悪液質の予備段階とも考えられ、担癌患者における3者サイトカインの産生増強はある程度までは生体の免疫能の正の働きの調節物質として考えられるが、その異常産生つまりホメオスターシスを逸脱した状況に至ればそれは生体機構の破綻につながるのかもしれない。

健常人と胃癌患者の各サイトカイン間の相互関係については、健常人ではいずれのサイトカイン間にも正の相関関係が認められたが、胃癌患者では IL-1β と TNFα にしか認められなかった。サイトカインの産生において、サイトカイン遺伝子の発現は最も重要な要素であり、その遺伝子発現の調節は mRNA の転写、安定性、翻訳の効率、合成された蛋白質の分泌など多くの過程で行われるが<sup>20</sup>、健常人においてはこれらの行程が一定の秩序をもって行われ、サイトカインが調和を保って合成されている<sup>3,20</sup>。一方、胃癌患者においては健常人とは異なる担癌生体という特殊な背景をもとに mRNA の一連の過程および合成された蛋白質の分泌など多くの過程のいずれかに3者サイトカインそれぞれの機能亢進が関与しているものと考えられる。

担癌生体の臨床病理学的所見と IL-1β，TNFα，IL-6 の関連は現在のところほとんど報告をみない。胃癌患者の予後因子として特に大きな意味を持っているものは組織学的進達度と組織学的リンパ節転移程度とされている<sup>49</sup>。著者の実験系では予後的漿膜面因子 (ps) においては IL-1β および TNFα がその進行度に伴い産生増強を認め、リンパ管侵襲においては IL-1β が ly(+) において産生能増強を認めた。この結果は担癌生体の癌の進行に伴い NK 活性<sup>13,14</sup>、IFNγ の低下<sup>15</sup>、PGE<sub>2</sub> の産生増強<sup>6</sup>あるいは IAP などの免疫抑制物質の増加<sup>47</sup> のため免疫系が負の方向に傾くが、生体のホメオスターシスを保つため免疫系の正の方向への働きとして IL-1β，TNFα の産生増強をきたしたと考えられる。そしてこれらのことは胃癌患

者の臨床病理学的所見をも部分的に反映しているものと思われ、さらに著者の示した IL-1β，TNFα における stage I，II 群に比し stage III，IV 群の産生能増強傾向も生体のホメオスターシスを保つため免疫系の正の方向への働きとして2者サイトカイン産生能が増強しているものと考えられ、癌の進行度におけるパラメーターとしての意義を示唆するものである。一方、IL-6 産生能においては臨床病理学的所見、stage 等、癌の進行度に反映しなかった。IL-6 の主たる働きはB細胞の最終分化段階の促進であるが担癌患者においてはB細胞の機能の低下は軽度であり<sup>50</sup>、癌の進行度を反映しにくいと考えられる。そのため担癌患者における IL-6 値は癌の進行度を反映しなかったものと考えられる。

手術の IL-1β，TNFα，IL-6 産生に及ぼす影響であるが、3者サイトカインは、細胞性免疫に関係すると同時に炎症にも強く関係している。よって手術の3者サイトカインに及ぼす影響を考える時、炎症、免疫の2つの面から考察する必要があると思われる。術後炎症機転時には3者サイトカインが関与すると報告されており<sup>51</sup>、手術の種類にもよるが一般に胃手術においては術後2週間までに炎症の機転は治癒すると考えられている<sup>52</sup>ので、今回、免疫学的見地から術後2週間目の Mφ による3者サイトカイン産生能を検討した。一般に手術侵襲が加わった生体において細胞性免疫能が低下することが指摘されているが<sup>53</sup>、著者の示した胃手術後2週間の3者サイトカイン値は術前の値に比し有意差は認められなかった。このことは術後2週間で細胞性免疫能に関与するもののうち、少なくとも Mφ の3者サイトカイン産生能という点においてはその機能が回復していることを示唆するものである。

以上から担癌状態の免疫機構に重要な役割を果たすサイトカインとしての IL-1β，TNFα，IL-6 を考慮すると、Mφ におけるこれらサイトカイン産生能の測定は担癌患者の免疫能を評価するうえできわめて有用であると考えられ

る。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり御指導，御校閲を賜った大柳治正教授，心臓外科学教室，城谷均教授，ならびに終始御指導，御協力をいただいた松本博城講師，白羽誠助教授に深甚なる謝意を捧げます。また，本研究に御協力をいただいた教室員各位に感謝いたします。

本論文の要旨は第27回日本癌治療学会総会（1989年10月，名古屋），第28回日本癌治療学会総会（1990年10月，東京），第29回日本癌治療学会総会（1991年10月，大阪）において発表した。

### 文 献

- Daniel N, Sauder MD. Interleukin 1. Arch Dermatol 1989 ; 125 : 679-682.
- Kishimoto T. The biology of interleukin-6. Blood 1989 ; 74(1) : 1-10.
- Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). The FASEB Journal 1990 ; 4 : 2860-2867.
- 岸本忠三. サイトカインの生物学と医学. Mebio 1990 ; 7(6) : 24-25.
- Aoki N, DeGoot LJ. PPD induced blastogenesis is auto-regulated by suppressor cells generated in vitro. Experientia 1979 ; 35 : 1515-1517.
- 寺田益士. 健常人および食道癌，胃癌患者における末梢血マクロファージの prostaglandin E2 産生能に関する基礎的臨床的検討. 日癌治 1991 ; 26(3) : 655-669.
- Aoki N, Ohno Y. Enhancement of the B-cell response to Staphylococcus aureus Cowan strain 1 by natural human gamma interferon. Immunology 1987 ; 60 : 51-55.
- Cannon JG, Van Der Meer JWM, Kwiatkowski D, et al. Interleukin-1 $\beta$  in human plasma: Optimization of blood collection, plasma extraction, and radioimmunoassay methods. Lymphokine research 1988 ; 7(4) : 457-466.
- 胃癌研究会編. 胃癌取扱規約. 11版. 東京: 金原出版, 1985.
- 田口鐵男. サイトカインの癌治療への応用・外科治療 1991 ; 65(2) : 172-180.
- 葛巻 暹. 癌と免疫異常. 小林 博編 免疫腫瘍学入門. 東京 蟹書房 1981 : 217-232.
- 古江 尚, 賀古 眞, 麦谷醒夫ら. 癌化学療法ならびに免疫療法下での免疫パラメーターに関する研究 (第6報) Biotherapy 1987 ; 1 : 59-63.
- 青木矩彦, 永田 格, 松本博城. 甲状腺癌と Natural killer 活性. 日癌治 1983 ; 18 : 1101-1107.
- 松本博城. ヒト natural killer cell activity の基礎的及び臨床的研究 (健常人及び消化器癌患者における検討). 日癌治 1985 ; 20 : 571-583.
- 泉谷 良. 健常人および消化器癌患者におけるヒト末梢血単核球の IFN- $\gamma$  産生能についての検討. 近畿大医誌 1989 ; 14 : 585-597.
- Oppenheim JJ, Kovacs EJ, Matsushima K, Durum SK. There is more than one interleukin 1. Immunol Today 1986 ; 7 : 45-56.
- Bendzen K. Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. Immunol Lett. 1988 ; 19 : 183-192.
- Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE et al. Human tumor necrosis factor: production, purification, and characterization. J Biol Chem 1985 ; 260 : 2345-2354.
- Balkwill FR, Burke F. The cytokine network. Immunol Today 1990 ; 10 : 299-304.
- 宮島 篤, 新井賢一. サイトカインネットワークとシグナル伝達. 実験医学 1989 ; 7 : 1693-1698.
- Gery I, Gershon RK, Waksman BH. Potentiation of the T lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell J Exp Med 1972 ; 136 : 128-138.
- Onozaki K, Matsushima K, Aggarwal BB, et al. Human interleukin 1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines. J Immunol 1985 ; 135 : 3962-3967.
- 笠原 忠. インターロイキン-1 (IL-1). Biotherapy 1988 ; 2(4) : 642-649.
- 笠原 忠. IL-1. 代謝 1988 ; 25 : 434-438.
- Muraguchi A, Kishimoto T, Miki Y, et al. T cell-replacing factor (TRF)-induced IgG secretion in human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. J Immunol 1981 ; 127:412-416.
- Muraguchi A, Hirano T, Tang B, et al. The essential role of B-cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. J Exp Med 1988 ; 167 : 332-344.
- Garman RD, Jacobs KA, Clark SC, Raulet DH. B-cell-stimulatory factor 2 ( $\beta$  2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. Proc Natl Acad Sci USA 1987 ; 84 : 7629-7633.



28. Lotz M, Jirik F, Kabouridis R, et al. B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J Exp Med* 1988 ; 167 : 1253-1258.
29. Takai Y, Wong G, Clark S, Burakoff S. B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1988 ; 140 : 508-512.
30. Andus T, Geiger T, Hirano T, et al. Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-β2) regulates β-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *Febs Lett* 1987; 221 : 18-22.
31. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL. et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *pros Natl Acad Sci USA* 1975 ; 72 : 3666-3670.
32. Niitsu Y, Watanabe N, Sone H. et al. T cell involvement in production of tumor necrosis factor: Reconstitution experiment with nude mice. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 1985 ; 76 : 395-399.
33. Niitsu Y, Watanabe N, Sone H. et al. Mechanism of the cytotoxic effect of tumor necrosis factor. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 1985 ; 76 : 1193-1197.
34. Watanabe N, Umetsu T, Sone H. et al. Stimulation of antitumorogenic cytotoxicity in macrophages by tumor necrosis factor. *Cancer J* 1988 ; 2 : 165-168.
35. Collins JL, Kao MS, Patek PQ. et al. Human express natural cytotoxic (NC) cell activity that is similar to murine NC cell activity. *J Immunol* 1987 ; 138 : 4180-4184.
36. 前田征洋, 渡辺直樹, 根田 寛ら. ヒト recombinant G-CSF との併用による TNF の抗腫瘍効果の増強. 第48回日本癌学会総会記事. 1989 : 277.
37. 川上正舒. TNF カケクチン. *ホルモンと臨床* 1987 ; 35 : 3-7.
38. Old LJ. Tumor necrosis factor. *Science* 1985; 230 : 630-632.
39. Le J, Vilcek J. Biology of disease tumor necrosis factor and Interleukin 1: Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 1987 ; 56 : 234-248.
40. 向田 篤, 笠原 忠, サイトカインと免疫ネットワーク. *臨床検査* 1991 ; 35(5) : 447-452.
41. Fidler IJ, Nii A, Utsugi T, Brown D, Bakouche O, Kleinerman ES. Differential release of TNFα, IL-1, and PGE<sub>2</sub> by human blood monocytes subsequent to interaction with different bacterial derived agents. *LYMPHOKINE RESEARCH* 1990 ; 4(9) : 449-463.
42. Hirose K, Zachariae COC, Oppenheim JJ, Matsushima K. Induction of gene expression and production of immunomodulating cytokines by PSK in human peripheral blood mononuclear cells. *LYMPHOKINE RESEARCH* 1990 ; 4(9) : 475-483.
43. Van Dame et al. Induction of a 26-kDa-protein mRNA in human cells treated with an interleukin-1-related, leukocyte-derived factor. *Eur J Biochem* 1985 ; 152 : 253-257.
44. Locksley RM, Heinzel FP, Shepard HM. et al. Tumor necrosis factor-α and β differ in the capacities to generate interleukin 1 release from human endothelial cells. *J Immunol* 1987 ; 139 : 1891-1895.
45. 小長谷昌攻. TNF とサイトカインネットワーク. *医学のあゆみ* 1990 ; 152(9) : 584-588.
46. 野口 淳, 松本博城, 青木矩彦. Kinetics of the production of IL-1β, TNFα and IL-6 in human monocytes. *Medical Postgraduates (印刷中)*
47. 高後 裕, 漆崎一郎. 血清中に出現する免疫抑制因子群. *癌と生体防御* 1985 : 7-25.
48. 漆崎一郎. ホメオスターシスの概念と最近の研究動向. *BIO THERAPY* 1991 ; 5(6) : 986-992.
49. 丸山圭一, 三輪 潔, 木下 平. 胃癌取扱い規約および TMN 分類の問題点と遠隔成績——Stage 分類の改訂を中心に——. *癌の臨床* 1986 ; 32(10) : 1357-1361.
50. 菊地浩吉, 森 道夫, 石井良文ら, 菊地浩吉編. *医科免疫学*. 東京: 南江堂, 1990.
51. 森 武貞, 村田厚夫. サイトカインと外科. *外科治療* 1991 ; 65(2) : 139-148.
52. 中村明茂, 高岡哲郎, 品川長夫, 由良二郎. 手術侵襲に対する感染防御能の変動. *消化器外科* 1988; 11 : 1943-1951.
53. 江上 寛, 荒川博文, 酒本喜与志, 池井 聡, 小川道雄. 手術侵襲とサイトカイン. *外科治療* 1991; 65(2) : 149-155.