

Tumor Necrosis Factor (TNF) の腫瘍細胞傷害機構の解析

曾根久雄

札幌医科大学内科学第4講座 (主任 漆崎一朗 教授)

Analysis of Cytotoxic Mechanism of Tumor Necrosis Factor

Hisao SONE

Department of Internal Medicine (Section 4), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. I. Urushizaki)

In view of further elucidating the cytotoxic mechanism of the tumor necrosis factor (TNF), the relationship between the number of TNF receptors and susceptibility to its cytotoxicity on TNF-sensitive tumor cells and on certain normal cells was firstly studied by a specific binding assay.

A fairly good correlation was shown between the receptor number and the sensitivity of the tumor cells.

However, for normal cells, despite the existence of TNF receptors, no cytotoxic effect was observed.

Furthermore, certain normal diploid cells underwent a proliferation as a result of TNF stimulation.

The internalization process and intracellular distribution of ^{125}I labeled TNF in L-M cell (murine tumorigenic fibroblasts, highly sensitive to TNF cytotoxicity) and HEL cell (human embryonic lung cells, non-sensitive to TNF cytotoxicity), were elucidated by pulse labeling and Percoll density gradient centrifugation.

In both L-M and HEL cells, receptor-bound ^{125}I -TNF was rapidly internalized and delivered to lysosomes within 15-30 min., followed by a degradation and release into the culture medium.

The impairment of the cytotoxic process by cytoskeletal disrupting or lysosomotropic agents also indicated that internalization of TNF into cells, followed by the fusion of pinosomes with lysosomes, is essential in the cytolytic mechanism of TNF.

Effect of TNF treatment on the RNA and protein synthesis of target cells was then studied using ^3H -UDR and ^{35}S -methionine incorporation.

RNA synthesis and protein synthesis were markedly enhanced by TNF treatment in L-M cells, but not in HEL cells.

By treating the L-M cells with actinomycin D or cycloheximide which inhibit RNA or protein synthesis, their susceptibility to TNF was rather increased.

And even in TNF non-sensitive HEL cells, the cytotoxic activity of TNF was newly evoked by using actinomycin D or cycloheximide.

These results suggest that TNF, bound on the surface receptors of tumor cells, is rapidly internalized into the cells and delivered to lysosomes, and that the lysosomal enzyme seemed to play an essential role in the cytolytic reaction since lysosomotropic agents impair the cytotoxic activity of TNF.

Normal cells, on the other hand, always are equipped with a defence system which protects them from cytotoxic attack of TNF.

Although tumor cells are also provided with this defence system, produced by the stimulation of TNF, they eventually undergo cytolysis by the attack of TNF due to its relative insufficiency.

(Received April 30, 1987 and accepted May 25, 1987)

Key words: Tumor necrosis factor, Cytotoxic mechanism, Internalization, Intracellular distribution, Defence mechanism

1 緒言

Tumor necrosis factor (TNF) は腫瘍細胞に対し強力な細胞傷害性を発揮する生体内活性物質¹⁻⁴⁾の一つであり, macrophage 由来^{5,6)}の monokine であることが知られている。

近年, ヒト⁷⁻¹⁰⁾, マウス¹¹⁾, 家兎¹²⁾の各 TNF-cDNA が相次いでクローニングされ, それを用いて TNF の性状及び生物活性¹³⁻¹⁹⁾の解明が急速に進められている。反面, 腫瘍細胞傷害性の作用機序についてはいまだに不明な点が少なくない。

一般に cytokine は標的細胞膜上の receptor を介して, その作用を発現するとされているが, TNF も例外ではなく, 腫瘍細胞上の特異的 receptor²⁰⁾の存在が確認されている。

本研究では, TNF receptor 数と TNF 感受性との関係について検討する目的で, まず, 各種腫瘍細胞株及び正常2倍体線維芽細胞を対象とし, ¹²⁵I 標識ヒト recombinant TNF を用いた binding assay により TNF receptor 数を測定した。

また, pulse label 及び Percoll density gradient による細胞分画法で receptor 結合後の TNF の細胞内への取り込みと, その後の細胞内分布を調べた。

さらに, TNF が各種腫瘍細胞株及び正常2倍体線維芽細胞の RNA 合成, 蛋白合成に与える変化を検討し, TNF の細胞傷害性機序について解析した。

2 材料と方法

2.1 ヒト recombinant tumor necrosis factor 及び試薬

ヒト recombinant TNF (以下 TNF) は旭化成工業株式会社より提供を受けた。Microfilament disrupting agent として用いた cytochalasin B, cytochalasin D は Aldrich Chemical Company, Inc. より購入, microtubule disrupting agent である colchicine は和光純薬, colcemid, vinblastine は半井化学薬品より購入した。Lysosomotropic agent である methylamine, ammonium chloride はキンダ化学, chloroquine は SIGMA, leupeptine は半井化学薬品より購入した。

RNA 合成及び蛋白合成阻害剤として actinomycin D (万有製薬), cycloheximide (SIGMA) を用いた。

2.2 細胞培養

研究対象として, 腫瘍細胞株である L-M (mouse tumorigenic fibroblast) 細胞, B-16 (mouse melanoma) 細胞, HeLa (human uterine cervix cancer) 細胞, L-R (TNF resistant cell line) 細胞及び, 正常2倍体細胞である HEL (human embryonic lung) 細胞, IMR (human embryonic lung) 細胞, HET (human embryonic tongue) 細胞, 計7種の培養細胞株を用いた。

L-R 細胞は, L-M 細胞を徐々に濃度を増した TNF 存在下 (1 U/ml ~ 5 × 10⁵ U/ml) で培養を繰り返しくローニングした TNF 抵抗株である。

なお, これらの細胞はすべて Table 1 に示した諸施設より恵予を受け, 当研究室で継代した。

L-M, L-R, HEL, HET 細胞の培養には, 10% 牛胎児血清 (FBS) 加 Eagle's minimal essential medium (Eagle MEM, ニッスイ) を, B-16, HeLa 細胞の培養には 10% FBS, ペニシリン 100 unit/ml, カナマイシン 100 mg/L を含む RPMI-1640 medium (GIBCO) を, IMR 細胞の培養には 10% FBS, ペニシリン 100 unit/ml, カナマイシン 100 mg/ml を含む Dalbecco's modified Eagle MEM (DMEM, GIBCO) をそれぞれ用いた。培養は組織培養フラスコ (Falcon 社, 3024) 中で 37°C 5% CO₂ の条件でおこない, 培養液は最低 3~5 日に 1 回交換した。細胞の生存率は随時 trypan blue dye exclusion 法により算出した。FBS は Flow Laboratories 社 (CAT. No. 29-101-54-North Ryde, N. S. W., Australia) より購入し, 56°C 30 分非働化後使用した。

2.3 細胞傷害性の測定法

TNF の細胞傷害性の測定は dye-uptake 法²¹⁾でおこなった。

すなわち, 標的細胞を 1 × 10⁵ 個/ml に調整し, その 100 μl を培養プレート (住友ベークライト社, MS-3096) の各 well に濃度を変えた TNF 溶液 100 μl とともに加え, 48 時間培養した。培養終了後, 25% glutaraldehyde (キンダ化学) 溶液 20 μl を加え 15 分間固定, 水洗, 乾燥し, 0.05% methylene blue 溶液で染色した。その後, 0.03 N HCl 溶液 200 μl を加え, ELISA analyzer (SLT-LABINSTRUMENT 社, EAR400) を用いて波長 665 nm で吸光度を測定した。% cytotoxicity の計算には次の式を用いた。

$$\% \text{cytotoxicity} = \left(1 - \frac{\text{TNF 処理細胞の } A_{665}}{\text{TNF 非処理細胞の } A_{665}} \right) \times 100(\%)$$

また、TNF 活性は L-M 細胞に対し 50% cytotoxicity を示す TNF 濃度を 1 unit (U) として示した。

2.4 TNF receptor 数の解析法

2.4.1 ¹²⁵I 標識 TNF の作製

¹²⁵I 標識 TNF の作製は Bolton and Hunter reagent (specific activity 4000Ci/mmol, Amersham International plc., Buckinghamshire, England) を用いて、Bolton ら²²⁾ の方法に準じておこなった。得られた¹²⁵I 標識 TNF の比活性は 2.7×10^5 cpm/ μ g であった。

2.4.2 Binding assay

細胞表面の TNF receptor の binding assay は以下の方法でおこなった。

すなわち、細胞を 12 well 培養プレート (Coster 社, Tissue Culture Cluster) の各 well に $4 \sim 5 \times 10^5$ 個ずつ加え、24 時間培養した。培養終了後、0.1% bovine serum albumin (BSA, 片山化学) 加 medium で 3 回洗浄して得られた 5×10^5 個の細胞を¹²⁵I 標識 TNF 及び $3.7 \mu\text{M}$ の非標識 TNF とともに 4°C 、1 時間インキュベーションした。その後、1% FBS 加 medium で 3 回洗浄し、0.5 M NaOH で溶出される細胞表面に結合した放射エネルギーを γ -counter (Compugamma 社, LKB-1282) で測定し total binding, nonspecific binding より specific binding を求めた。

2.4.3 Scatchard plot analysis

細胞 1 個あたりの receptor 数、及び解離定数は Scatchard plot analysis²³⁾ により求めた。

2.5 ¹²⁵I 標識 TNF の細胞内への取り込み、分解、排泄の解析

TNF の細胞内への取り込み、分解、排泄の解析は、Yonehara ら²⁴⁾ の方法に準じて検討した。

まず、 5×10^5 個の細胞を 6 well 培養プレート (Falcon 社, 3046) の各 well に加え 24 時間培養後、培養液をあらかじめ 4°C に冷却した ¹²⁵I 標識 TNF (5 nM) を含む 0.1% BSA 加 Eagle MEM 0.5 ml に置換し、 4°C 1 時間 pulse label した。その後各 well を 4°C に冷却した 0.1% BSA 加 Eagle MEM で 2 回洗浄し、培養液を 37°C に加温した 10% FBS 加 Eagle MEM に置換した後、12, 30, 60, 120, 240 分間培養した。培養終了後、各時点で細胞と培養液を遠心 ($800 \times g$, 5 分間) により分離し、細胞はその表面に結合している ¹²⁵I 標識 TNF 量と細胞内へ取り込まれた ¹²⁵I 標識 TNF 量を検討するために、また、培養液は細胞外へ排泄された

TNF の分解産物量を検討するために用いた。すなわち、各 well の上清を 0.5 ml ずつ採取し 20% trichloroacetic acid (TCA, 片山化学) 溶液 0.5 ml を加え、 $10,000 \times g$, 5 分間遠心後、その上清 0.5 ml 中の放射エネルギーを degradation product fraction (TCA soluble) として γ -counter で測定した。

一方、細胞については、0.1% BSA 加 Eagle MEM で洗浄後、0.2% trypsin (SIGMA), 0.02% ethylenediaminetetraacetate (EDTA, 協和純薬) を含んだ phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 を 0.5 ml ずつ加え、10 分間 37°C でインキュベーションし、細胞表面に結合している ¹²⁵I 標識 TNF を細胞より解離させた。5,000 rpm (KUBOTA 遠心器, KH-150) 2 分間遠心後、その上清 0.2 ml 及び遠沈された細胞の放射エネルギーを γ -counter で測定し、それぞれ、surface bound fraction (trypsin released), internalized fraction (trypsin unreleased) とした。

2.6 ¹²⁵I 標識 TNF の細胞内分布の解析

2.6.1 Percoll density gradient fractionation

まず、細胞 1×10^7 個を 5 nM の ¹²⁵I 標識 TNF を含む 0.1% BSA 加 Eagle MEM 中で 4°C 1 時間 pulse label した。その後 0.1% FBS 加 Eagle MEM で 3 回洗浄し、培養液を 37°C に加温した 10% FBS 加 Eagle MEM に置換した後、3, 15, 30, 60 分間培養した。培養終了後 Miskimins ら²⁵⁾ の方法に従い、細胞を低張 buffer (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM acetic acid, 10 mM ethanolamine, pH 7.4) 1.1 ml 中で pipetting (Labsystems Oy 社, FINNPIPETTE DIGITAL) により破砕し、 $800 \times g$, 10 分間遠心して上清を得た。この上清 1 ml を 20% Percoll (Pharmacia), 0.25 M sucrose 溶液 9 ml に重層し、18,000 g 90 分遠心後 (HITACHI-SCR 20BB), 遠心チューブの底部から分画採取し、その一部は次項 2.6.2 で述べる marker enzyme の測定に用い、残りの分画は、各分画の放射エネルギーを γ -counter で測定し、¹²⁵I 標識 TNF の細胞内分布を調べた。

2.6.2 細胞内顆粒の marker enzyme の測定法

2.6.1 の項で分画したものの、どの分画に lysosome, Golgi body, endoplasmic reticulum (ER) が存在するかを確認する目的で、lysosome の marker enzyme として acid phosphatase 及び β -glucuronidase, Golgi body は UDP-galactose-glycoprotein galactosyl transferase, ER は NADPH cytochrome C reductase の 4 種類の enzyme 活性を各分画について測定した。

Acid phosphatase 活性は Walter ら²⁶⁾の方法に従い, para-nitrophenyl phosphate (SIGMA)を基質とし反応産物である para-nitrophenol の吸光度 (A_{405}) を測定した.

β -glucuronidase 活性は Barrett ら²⁷⁾の方法に従い, para-nitrophenyl-glucuronide (SIGMA)を基質とし反応産物である para-nitrophenol の吸光度 (A_{405}) を測定した.

UDP-galactose-glycoprotein galactosyl transferase 活性は Miskimins ら²⁵⁾の方法に従い, UDP-³H-galactose (25 Ci/mol, New England Nuclear), ovalbumin を基質とし, 反応産物である, ³H-galactose-ovalbumin の方射エネルギーを液体シンチレーションカウンター (Beckman 社, LS-250) で測定した.

NADPH cytochrome C reductase 活性は Miskimins ら²⁵⁾の方法に従い, cytochrome C (SIGMA) と NADPH を基質とし, 反応産物である環元型 cytochrome C の吸光度 (A_{550}) を測定した.

なお, 密度勾配は各分画 1 ml ずつを秤量後, その密度を算出して確認した.

2.7 RNA 合成測定法

RNA 合成の測定は以下の方法でおこなった.

すなわち, 細胞 $1 \sim 2 \times 10^5$ 個/ml に調整し, 24 well 培養プレート (Nunc 社, Nunclon) の各 well に 1 ml ずつ加え, TNF (100 U/ml) 存在下で経時的 (2, 12, 24, 36, 48 時間) に培養した. 培養終了後, Ostrove ら²⁸⁾の方法に準じ $10 \mu\text{Ci}$ ³H-UDR (35 Ci/m mol, New England Nuclear) を加え 1 時間インキュベーションし, 4°C に冷却した PBS で 1 回, 5% TCA 溶液で 2 回洗浄した. その後, 1 ml の 5% TCA 溶液を加え, 80°C 1 時間加熱処理し, 上清 0.2 ml 中の放射エネルギーを液体シンチレーションカウンターで測定し RNA の合成量を測定した.

なお, 合成された RNA 量は, この放射エネルギーを生細胞数で補正し, 細胞 1 個あたりの量に換算後, 比較検討した.

2.8 DNA 合成の測定法

DNA 合成の測定は, 2.7 に述べた方法のうち, ³H-UDR の代わりに $10 \mu\text{Ci}$ の ³H-TdR (21 Ci/mmol, Amersham International plc.) の細胞内への取り込みを測定して求めた.

2.9 Total RNA, messenger RNA (m RNA) の分離法

Total RNA の分離は Chirgwin ら²⁹⁾の方法で, m RNA の分離は Aviv ら³⁰⁾の方法に準じておこなった.

すなわち, L-M 細胞または HEL 細胞を対象とし, 5×10^7 個の細胞を TNF (100 U/ml) 存在下で 24 時間培養後, guanidine isothiocyanate (片山化学) 法で total RNA を分離した. つぎに, この total RNA を Oligo dT cellulose column (type II, COLLABORATIVE RESEARCH 社) に添加し, 吸着した分画を 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 で溶出し mRNA 分画とした. なお, RNA 量は $OD_{260}^{1\%} = 250$ より算出し, 生細胞数で補正後, 細胞 1×10^6 個あたりの量に換算して比較検討した.

2.10 蛋白合成測定法

蛋白合成の測定は metabolic label 法³¹⁾でおこなった. すなわち, Eagle MEM で 1×10^6 個/ml に調整した細胞浮遊液 5 ml を培養フラスコ (Falcon 社, 3013) 中で 2 時間培養後, 培養液を ³⁵S-methionine (85 Ci/mmol, Amersham International plc.) $7.6 \mu\text{Ci}$, TNF (100 U/ml) を含んだ methionine-free Eagle MEM に置換し, さらに, 2, 12, 24, 36, 48 時間培養した. 培養終了後, 0.2% trypsin, 0.02% EDTA を含んだ PBS (pH 7.4) 5 ml で細胞を剝離し, 800 g 5 分間遠心して沈殿としたのち, PBS (pH 7.4) 20 ml で 1 回洗浄した. 洗浄終了後, 1% TritonX-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.1% BSA, 5 mM EDTA を含む PBS (pH 7.4) 1 ml を加えピペットで細胞を混和・破碎したのち, 800×g, 10 分間遠心した. その上清 100 μl に 20% TCA 溶液 1 ml を加え, 10,000×g, 5 分間遠心した. その沈殿物を 5% TCA 溶液 1 ml で洗浄後, 5 ml の Aquasol (New England Nuclear) に溶解し, 放射エネルギーを液体シンチレーションカウンターで測定した.

なお, 蛋白合成量は生細胞 1 個あたりの量に換算し比較検討した.

3 結 果

3.1 各種腫瘍細胞株並びに正常 2 倍体線維芽細胞の TNF receptor 数と TNF に対する反応性との比較検討

腫瘍細胞株 4 種, 正常 2 倍体線維芽細胞 3 種を対象とし, TNF receptor 数を ¹²⁵I 標識 TNF を用いた binding assay で測定した. さらに, これらの細胞の TNF に対する反応性について検討した (Table 1).

L-M 細胞, B-16 細胞, HeLa 細胞では細胞 1 個あたり, それぞれ, 11,400 個, 5,100 個, 900 個の TNF receptor が存在していた. 各細胞に対する細胞傷害性

Table 1 TNF receptors on the surface of various cell lines.

cell lines	receptor		relative cytotoxicity*
	number/cell	Kd($\times 10^{-10}$ M)	
L-M mouse tumorigenic fibroblast ^{a)}	11,400	8.2	1.0
B-16 mouse melanoma ^{b)}	5,100	6.3	0.79
HeLa human uterine cervix cancer ^{c)}	900	5.1	0.05
L-R TNF resistant cell line ^{a)}	n. d.**		n. d.
HEL human embryonic lung cell ^{a)}	3,500	7.3	n. d.***
IMR human embryonic lung cell ^{a)}	4,700	2.7	n. d.***
HET human embryonic tongue cell ^{a)}	6,600	3.9	2.03***

* relative cytotoxicity against the cytotoxicity of L-M cell determined by dye uptake assay (TNF: 1×10^4 U/ml).

** n. d.: not detectable.

*** incubated for 7 days.

Cells were kindly provided by

a) The Asahi Chemical Industry., Institute.

b) Dr. K. Kikuchi Dept. Path., Sapporo Medical College.

c) Dr. K. Fujinaga Dept. Can. Res. Inst., Sapporo Medical College.

を、同時に測定した L-M 細胞の % cytotoxicity に対する比率で調べたところ、TNF 1×10^4 U/ml 存在下で、それぞれ、相対的傷害活性は 0.79, 0.05 であった。また、TNF 抵抗性細胞株である L-R 細胞では、TNF receptor の存在は認められなかった。

一方、正常 2 倍体線維芽細胞株である HET, IMR, HEL 細胞では、それぞれ、6,600 個, 4,700 個, 3,500 個の TNF receptor が存在していたにもかかわらず、いずれの細胞においても TNF の細胞傷害性は認められず、HET 細胞は、培養 7 日後には、むしろ細胞数は TNF

添加により非添加時に較べ約 2 倍に増加していた。

なお、receptor の解離定数は、いずれの細胞においても 10^{-10} M オーダーで、TNF 感受性の有無にかかわらずその結合力に差異は認めなかった。

すなわち、種々の培養細胞に対する TNF の細胞傷害活性の強さを receptor 数の多寡のみで説明することは困難であった。

3.2 L-M 細胞並びに HEL 細胞における TNF の内包化、分解、排泄過程の比較

L-M 細胞及び HEL 細胞を対象とし、pulse label 後

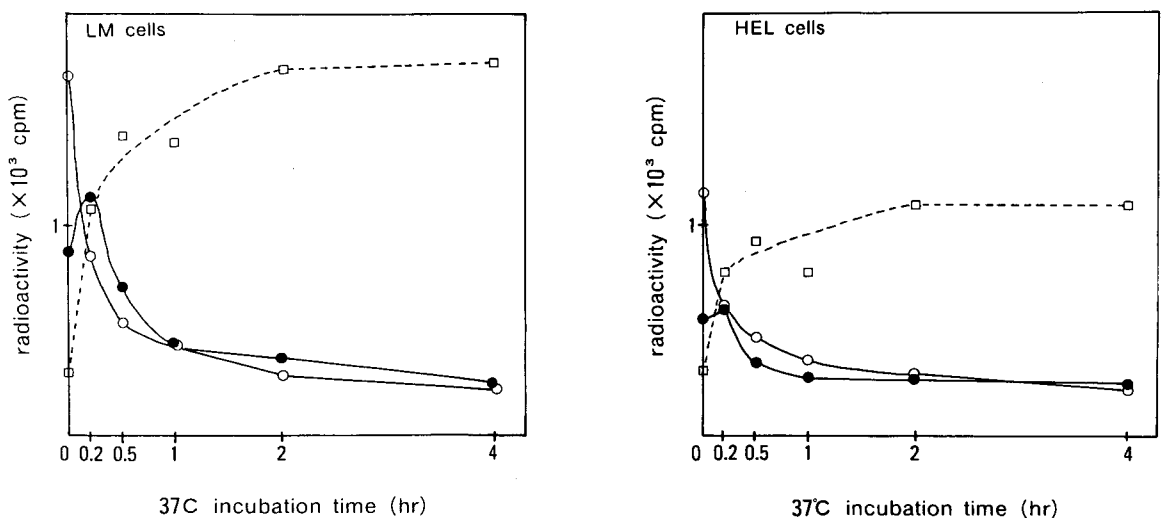


Fig. 1 Internalization and degradation of 125 I-TNF by L-M and HEL cells.

TCA soluble (\square ----- \square), Trypsin released (\circ — \circ), Trypsin unreleased (\bullet — \bullet)

の ^{125}I 標識 TNF の細胞内への取り込み, 分解, 排泄の過程について検討した (Fig. 1).

L-M 細胞及び HEL 細胞の両者ともに, インキュベーション開始後 12 分で細胞内に取り込まれた放射エネルギーのピークが認められ, 以降漸減した (●—●). 細胞表面の receptor に結合した ^{125}I 標識 TNF は, インキュベーション開始後速やかに減少し, 60 分後には消失した (○—○). また, degradation product を反映する上清中の TCA 可溶分画の放射エネルギーは, インキュベーション開始後直ちに上昇し始め, 120 分後にはプラトーに達した.

すなわち, TNF の内包化, 分解, 排泄過程については, 両細胞間に差異は認められなかった.

3.3 L-M 細胞並びに HEL 細胞に取り込まれた TNF の細胞内分布の検討

つぎに, 細胞内に取り込まれた後の TNF の細胞内分布について Percoll density gradient 分画法で検討した.

まず, TNF 非処理 L-M 細胞を Percoll density gradient で分画し, その各 subcellular fraction の marker enzyme 活性を測定したところ, lysosome の marker enzyme である acid phosphatase 及び β -glucuronidase, Golgi body の marker enzyme である UDP-galactose-glycoprotein galactosyl transferase, ER の marker enzyme である NADPH cytochrome C reductase の活性ピークは, それぞれ, fraction No. 1, 23, 31, に認められた (Fig. 2).

ついで, L-M 細胞を 5nM ^{125}I 標識 TNF と, 4°C 1 時間インキュベーション後, 37°C の条件下にうつし, 放射エネルギーの細胞内分布の推移を調べたところ, 放射エネルギーのピークは, 15 分で lysosome 分画に認められ, 60 分後には消失した (Fig. 3).

なお, 3 分後に低密度分画に認められた放射エネルギーは, prelysosome 分画, または, 未分離の細胞膜断片に結合した ^{125}I 標識 TNF を反映したものと推測された.

一方, HEL 細胞においても L-M 細胞同様に 15 分で lysosome 分画に放射エネルギーのピークが認められ, 60 分後には消滅した. したがって, 細胞内に取り込まれた後の TNF の分布については, L-M 細胞と HEL 細胞に差は認めなかった.

3.4 TNF の L-M 細胞傷害性に対する cytoskeletal disrupting agent の阻害作用

TNF の細胞内への取り込みが, 細胞傷害性を発揮する上で必要な過程であるか否かを, microfilament disrupting agent である cytochalasin B, cytochalasin D, microtubule disrupting agent である colchicine,

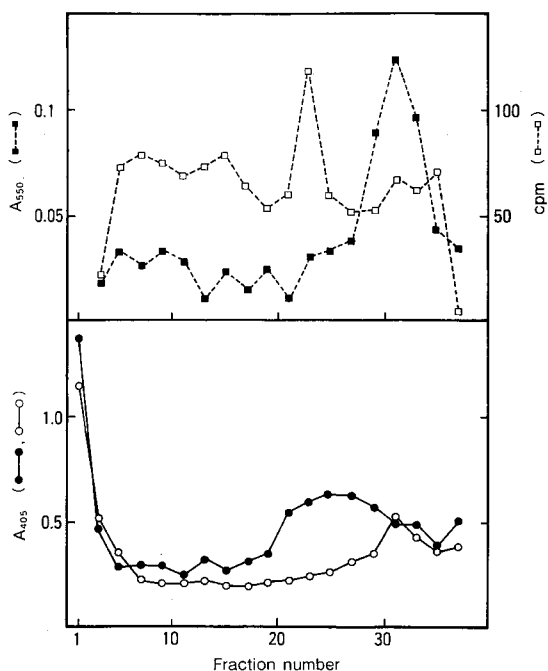


Fig. 2 Distribution of markers of subcellular organelles in L-M cells on Percoll density gradients.

- : acid phosphatase (lysosome)
- : β -glucuronidase (lysosome)
- : UDP-galactosyl transferase (Golgi body)
- : NADPH cytochrome C reductase (endoplasmic reticulum)

colcemid, vinblastine の計 5 種の阻害剤を用い検討した.

各阻害剤を table 2 に示す濃度で L-M 細胞に添加し, 30 分後³²⁾に TNF (10 U/ml) を加え, 2.3 で述べた方法で細胞傷害性を調べた.

L-M 細胞に対する TNF の細胞傷害性は, 阻害剤非添加時には 91.2%であったのに対し, cytochalasin B, cytochalasin D の添加時には, それぞれ 64.3%, 67.7%, colchicine, colcemid, vinblastine の添加時には 43%, 56.2%, 44.7%と低下した. すなわち, TNF の細胞内への取り込みが, 細胞傷害性を発揮する上で必要な過程であることが示唆された.

3.5 TNF の L-M 細胞傷害性に対する lysosomotropic agent の阻害作用

lysosomal enzyme の阻害物質が TNF の細胞傷害性に与える影響を, methylamine, ammonium chloride, chloroquine, leupeptin の計 4 種の阻害剤を用いて検討した. Table 3 に示すように methylamine 10 μM , ammonium chloride 200 μM , chloroquine 5

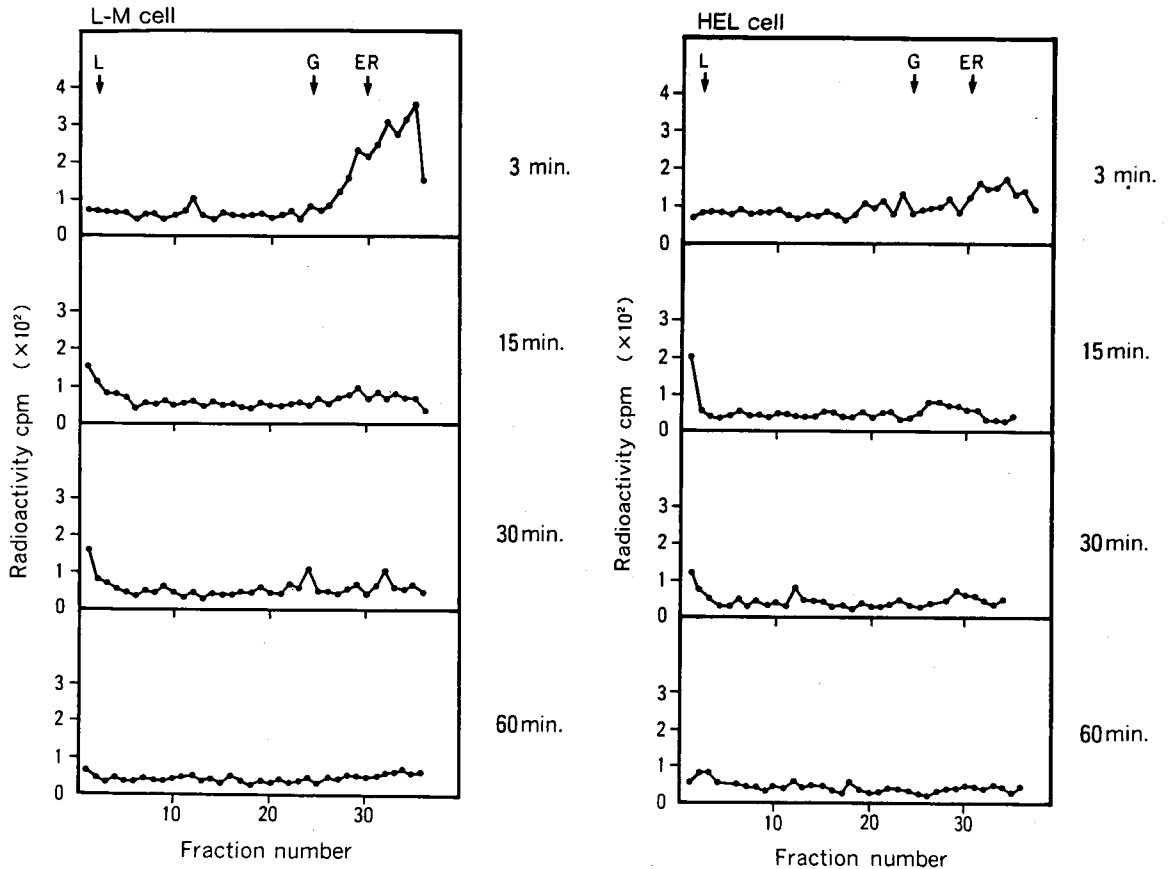


Fig. 3 Intracellular distribution of ^{125}I -TNF in L-M and HEL cells. L, G, ER denote the position of lysosome, Golgi body and endoplasmic reticulum.

Table 2 Inhibitors influencing L-M cell sensitivity to TNF.

treatment	function	concentration of agent	% cytotoxicity ^{a)}
no treatment			91.2±5.2
Cytochalasin B	} microfilament disrupting agent	20 μM	64.3±3.9*
Cytochalasin D		20 μM	67.7±4.2*
Colchicine	} microtubule disrupting agent	20 μM	43.8±3.7*
Colcemid		100 μM	56.2±4.3*
Vinblastine		1 μM	44.7±3.6*

TNF: 10 U/ml *p<0.02

a) Mean±SD of 5 separate experiments.

μM は TNF (10 U/ml) 添加 30 分前³³⁾ に, leupeptin 50 μM は TNF 添加 20 時間前³⁴⁾ にそれぞれ L-M 細胞に添加し, 2・3 に述べた方法で細胞傷害性を測定した。

TNF の細胞傷害性は, 対照とした阻害剤非添加細胞では 91.2%であったのに対し, 4 種の lysosomotropic agent を添加した細胞では 60.1%~71.5%といずれも

有意に低下していた。すなわち, TNF の細胞傷害性発現のために, lysosomal enzyme の関与が示唆された。

3・6 TNF 処理各種腫瘍細胞及び HEL 細胞における RNA 合成, 蛋白合成の変化

3・6・1 RNA 合成に与える影響

TNF が各種腫瘍細胞株及び HEL 細胞の RNA 合成

Table 3 Effects of lysosomotropic agents on L-M cell sensitivity to TNF.

treatment	concentration of agent	% cytotoxicity ^{a)}
no treatment		91.2±5.2
Leupeptin	50 μM	71.2±4.9**
Methylamine	10 μM	61.3±3.4*
Ammonium chloride	200 μM	52.8±3.7*
Chloroquine	5 μM	60.1±3.1*

TNF: 10 U/ml *p<0.02 **p<0.05

a) Mean±SD of 5 separate experiments.

に与える影響を、経時的に³H-UDRの取り込みを測定し検討した (Fig. 4). L-M, B-16, HeLa 細胞では、TNF (100 U/ml) 添加12時間後よりRNA合成が増加しはじめ、24時間後にはそれぞれTNF非添加時に比し、約3.5倍、2.3倍、1.4倍に上昇した。その増加の程度は、TNF抵抗性と逆比例していた。

一方、HEL細胞、L-R細胞では、RNA合成の増加は認められなかった。

3・6・2 蛋白合成に与える影響

TNFがL-M細胞及びHEL細胞の蛋白合成に与える影響を、経時的に³⁵S-methionineの取り込みを測定

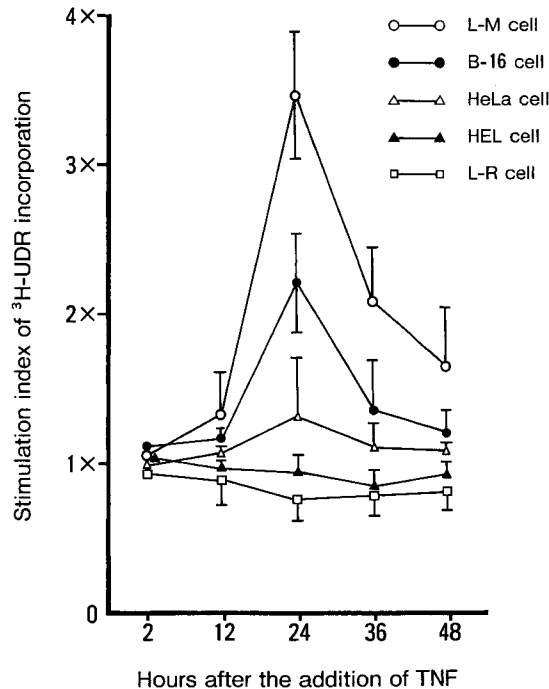


Fig. 4 Effects of TNF on RNA synthesis in various cell lines.

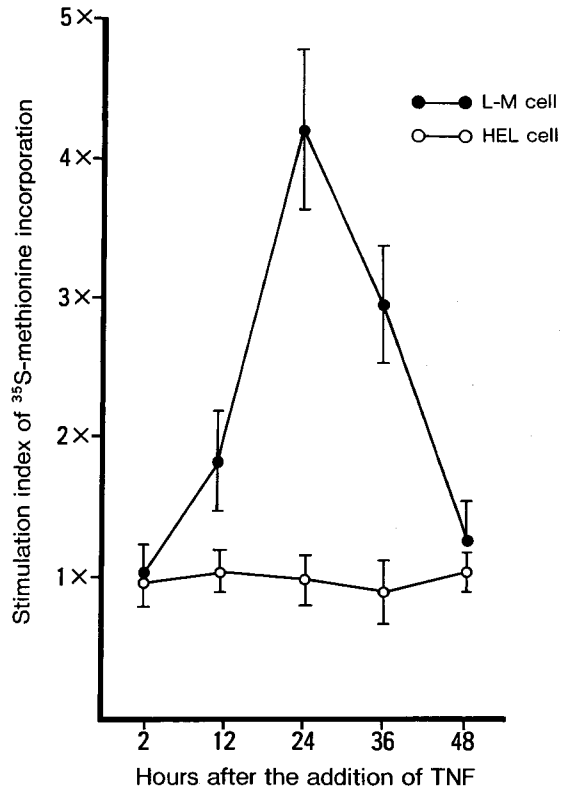


Fig. 5 Effects of TNF on protein synthesis in L-M and HEL cells.

し検討した (Fig. 5).

L-M細胞では、TNF (100 U/ml) 添加12時間後より蛋白合成が増加し始め、24時間後にはTNF非添加時の約4.2倍に上昇した。

一方、HEL細胞では、蛋白合成の増加は認められなかった。

3・6・3 Total RNA合成量及びmRNA合成量の比較検討

L-M細胞及びHEL細胞において、RNA合成、蛋白合成の増加が最も顕著であった、TNF添加24時間後の両細胞から、total RNA, mRNAを実際に抽出し、その量的変化を比較検討した。Table 4に示すようにL-M細胞では、total RNA量は細胞 1×10^6 個あたり、TNF非添加時476.3 μgであったのに対し、TNF添加時1448.2 μgと約3倍に増加し、mRNA量も、TNF非添加時、添加時でそれぞれ3.4 μg, 17.4 μgと約5.1倍に増加していた。また、% mRNAはTNF添加により、約1.7倍の増加を示した。

一方、HEL細胞では、total RNA量は、TNF非添加時・添加時で、459.5 μg, 452.4 μgと差異は認めら

Table 4 Effects of TNF on total RNA and mRNA levels in L-M and HEL cells.

Cell		total RNA ^{a)} ($\mu\text{g}/1 \times 10^6$ cells)	mRNA ^{a)} ($\mu\text{g}/1 \times 10^6$ cells)	% mRNA
L-M Cell	TNF	1448.2 \pm 47.3	17.4 \pm 1.2	1.20
	No treatment	476.3 \pm 58.6	3.4 \pm 0.8	0.71
	TNF	452.4 \pm 38.7	2.1 \pm 0.5	0.46
HEL Cell		n. s. ^{b)}	n. s.	
	No treatment	459.5 \pm 41.9	1.9 \pm 0.6	0.41

a) Mean \pm SD of 5 separate experiments.

b) n. s.: not significant

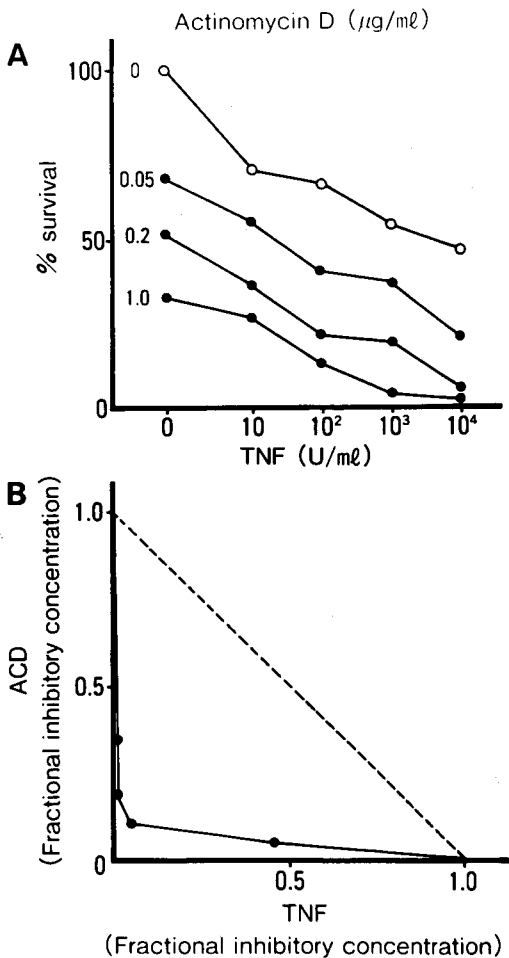


Fig. 6 Effect of Actinomycin D on susceptibility of L-M cell to TNF.
 A : dose dependent cytotoxicity of TNF in the presence of Actinomycin D
 B : analysis of synergistic effect by isobologram

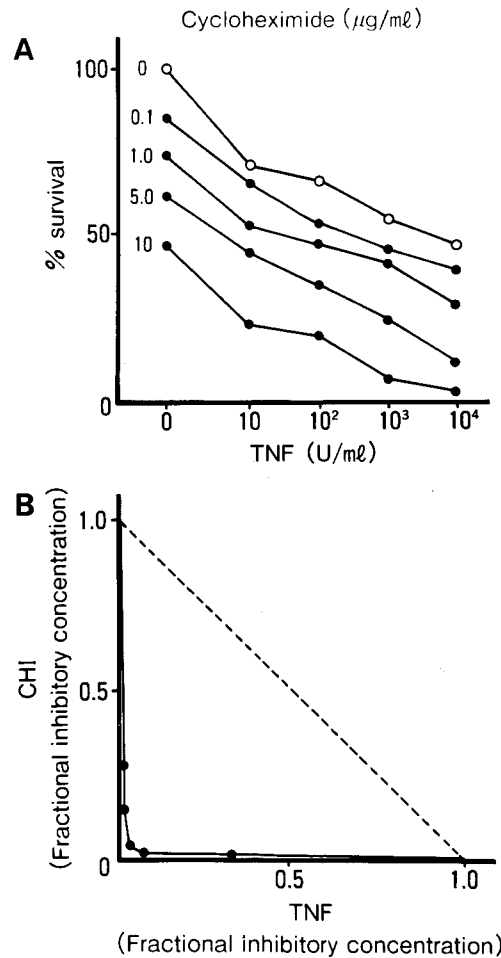


Fig. 7 Effect of Cycloheximide on susceptibility of L-M cell to TNF.
 A : dose dependent cytotoxicity of TNF in the presence of Cycloheximide
 B : analysis of synergistic effect by isobologram

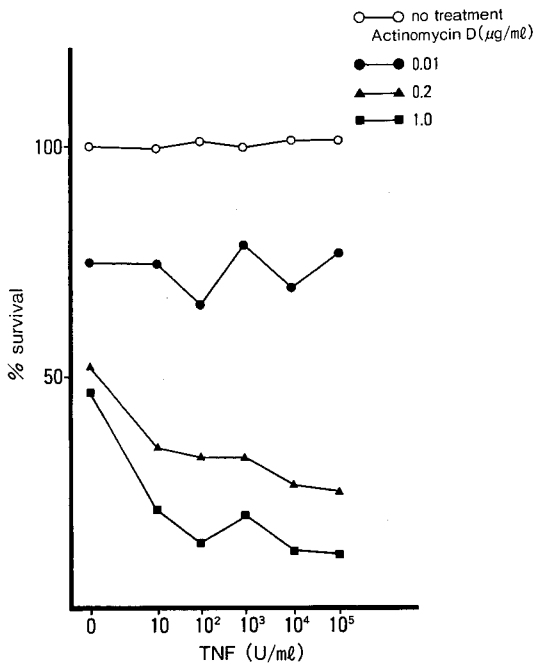


Fig. 8 Effect of Actinomycin D on HEL cell sensitivity to TNF.

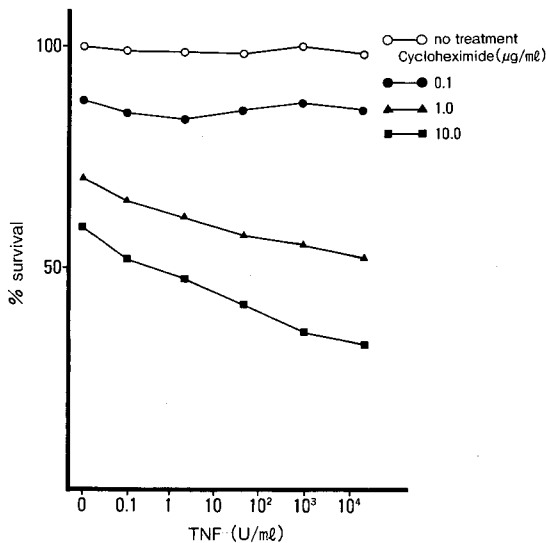


Fig. 9 Effect of Cycloheximide on HEL cell sensitivity to TNF.

れず、m RNA 量も TNF 非添加時で $1.9 \mu\text{g}$ 、添加時で $2.1 \mu\text{g}$ と有意差は認められなかった。

3.7 Actinomycin D, cycloheximide による TNF の L-M 細胞, HEL 細胞に対する細胞傷害性増強効果の検討

TNF 添加により、L-M 細胞で RNA 合成、蛋白合成が増加したことより、これらの物質の増加の意義を各阻害剤を用いて検討した。L-M 細胞, HEL 細胞を対象とし、RNA 合成阻害剤である actinomycin D $0.01 \sim 1.0 \mu\text{g/ml}$ または、蛋白合成阻害剤である cycloheximide $0.1 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ と TNF ($0.1 \sim 1 \times 10^4 \text{ U/ml}$) を、それぞれ 24 時間共存させ、2・3 の方法に準じ細胞傷害性を測定した。

Fig. 6, 7 に示すごとく、L-M 細胞では、ACD, CHI 処理により TNF に対する感受性は、濃度依存性に上昇した。その効果を、isobologram³⁵⁾ で検討したところ、明らかな相乗効果が確認された。

また、HEL 細胞では、ACD が $0.01 \mu\text{g/ml}$ 以下では影響はみられなかったが、 $0.2 \mu\text{g/ml}$ 及び $1.0 \mu\text{g/ml}$ の高濃度になると細胞傷害性が出現した (Fig. 8)。

また、CHI によっても、 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で、HEL 細胞に対する TNF の細胞傷害性の出現が認められた (Fig. 9)。

つまり、RNA 合成阻害剤、蛋白合成阻害剤などは、腫瘍細胞の TNF 感受性を高めるのみならず、正常 2 倍体細胞にも作用して、TNF 感受性を獲得せしめる働きを有しているものと考えられた。

4 考 察

TNF の抗腫瘍性が Old ら⁵⁾ によって最初に報告されたのは 1975 年であるが、以来ほぼ 10 年経った今日でも、なお、その機序については不明な点が少なくない。

腫瘍細胞についてはこれまで、細胞表面にその receptor の存在²⁰⁾ が確認されており、receptor 数と TNF 感受性の間には高い相関傾向が認められている²⁰⁾。

しかし、最近になって TNF 非感受性の正常細胞にも TNF receptor の存在が報告³⁶⁾ され、TNF receptor と TNF 感受性との関係が必ずしも明解とはいえなくなった。

本研究では、まず腫瘍細胞株及び正常 2 倍体細胞を対象とし、binding assay で TNF receptor 数を測定し、TNF に対する感受性との関係について検討した。

その結果、TNF 感受性の腫瘍細胞には既報²⁰⁾ のごとく TNF receptor が存在し、receptor 数と細胞傷害性との間には相関傾向が認められた。

一方、正常 2 倍体細胞株 3 種 (HEL, IMR, HET) にも、それぞれ細胞 1 個あたり、3,500, 4,700, 6,600 個の TNF receptor が見い出され、receptor の解離定数はいずれも 10^{-10} M オーダーで、腫瘍細胞のそれと差異が認められなかった。

しかし、これらの正常2倍体細胞では、TNFの細胞傷害性がみられないのみならず、ヒト胎児舌組織由来線維芽細胞 HET では逆に増殖刺激作用が認められた。

すなわち、TNF receptor の存在は、TNF が腫瘍細胞に対し細胞傷害性を発揮する上で、必要条件であるが十分条件ではないと考えられた。

そこで、ともに receptor を保有し、TNF に対する感受性の異なる腫瘍細胞 (L-M) 及び正常2倍体細胞 (HEL) を対象とし、receptor 結合後の TNF 分子の細胞内への取り込みについて検討した。

L-M 細胞では、4°C で ^{125}I 標識 TNF を細胞表面に pulse label した後、37°C で培養したところ、細胞表面の TNF receptor に結合した放射エネルギーは直ちに減少し、12分後には細胞内にピークが認められた。また、培養液の TCA 可溶分画中の放射エネルギーは培養開始直後より増加し、1時間後にはプラトーに達した。すなわち、TNF 分子は、receptor に結合した後細胞内に取り込まれ、30分以内に分解され再び細胞外に排出されることが明らかとなった。また、この過程を、cytochalasin, colchicine などの cytoskeletal disrupting agent で阻止すると TNF の細胞傷害性は阻害されることから、TNF の細胞内への取り込みは、TNF が細胞傷害性を発揮する上で必要条件と思われた。

一方、TNF の細胞傷害性が認められない正常2倍体細胞 (HEL) においても、receptor に結合した TNF は細胞内に取り込まれ、同様に短時間で分解・排泄されたことより、細胞内への取り込みという過程は TNF が細胞傷害性を発揮する上で十分条件とは言えなかった。

さらに、細胞内に取り込まれた後の TNF の細胞内分布を Percoll density gradient による細胞分画法により検討した。

その結果、L-M 細胞及び HEL 細胞ともに pulse label 後、15分で lysosome 分画に放射エネルギーのピークが認められ、60分後には消滅していた。

したがって、細胞内に取り込まれた TNF の細胞内分布に関しても腫瘍細胞と正常細胞とのに差異はみられなかった。

ただし、leupeptin, chloroquine などの lysosomotropic agent で lysosome の活性を抑制すると、対照の 91.2% に対し、60.1%~71.5% に細胞傷害性が抑制されたことから、TNF は lysosome へ移行した後、lysosomal enzyme の関与により、直接あるいは間接的に細胞傷害作用を発揮するものと考えられた。

つぎに、TNF に対する感受性の異なる各種培養細胞株を対象とし、TNF が RNA 及び蛋白合成に与える影

響を検討した。

まず、TNF の total RNA 合成に与える影響を経時的に ^3H -UDR の取り込みで調べたところ、TNF 感受性の腫瘍細胞株では、TNF 添加12時間後より RNA 合成が増加し、24時間後には L-M 細胞、B-16 細胞、HeLa 細胞で、それぞれ非添加時の約 3.5 倍、2.3 倍、1.4 倍と増加し、その程度は TNF 感受性と相関していた。

さらに、RNA 合成の増加が最も顕著であった TNF 添加24時間後の L-M 細胞から実際に total RNA, m RNA を抽出し、その量的変化を比較検討したところ、TNF 非添加時に比べ、それぞれ約 3 倍、5.1 倍に増加していた。

また、 ^{35}S -methionine の取り込みで調った蛋白合成も、TNF 添加12時間後より増加し始め、24時間後には 4.2 倍に増加していた。

一方、TNF 非感受性の HEL 細胞、L-R 細胞では、TNF 添加により total RNA 合成、蛋白合成の変化はみられず TNF 感受性細胞と顕著な差異が認められた。

しかしながら、TNF により惹起される RNA 合成及び蛋白合成の増加のピークが、細胞がすでにある程度の崩壊をきたしている24時間後に認められたことは、この増加が細胞崩壊の引き金になる反応ではなく、むしろ二次的な反応である可能性を示唆するものであった。

そこで、TNF 添加により L-M 細胞内に増加した RNA、蛋白の意義について RNA 合成阻害剤である ACD、蛋白合成阻害剤である CHI を用い検討した。

その結果、ACD 及び CHI との共存で TNF の細胞傷害性は低下せず逆に増強した。

したがって、L-M 細胞において TNF により惹起される RNA・蛋白合成の増加は、それを ACD、CHI との共存で阻害すると TNF の細胞傷害性が増強すること、及び、RNA・蛋白合成のピークが、細胞がすでにある程度の崩壊をきたしている24時間後のみとめられたことから、細胞傷害性の反応ではなく、細胞の修復あるいは抵抗性獲得のための反応(防御反応)を反映しているものと考えられた。

一方、TNF 添加により RNA 合成、蛋白合成に変化が認められなかった HEL 細胞において、ACD または CHI を共存させると、TNF 単独ではみられなかった細胞傷害性が出現した。すなわち、正常細胞では常時防御機構が存在し、TNF 抵抗性を示すことが推測された。

以上の結果より、TNF は腫瘍細胞表面の receptor

を介して細胞内に取り込まれ、lysosomeへ搬入される過程でそのcytotoxic signalを発することが考えられ、lysosomal enzymeがその重要な因子として一翼を担っていることが示唆された。

また、正常細胞にはもともとTNFに対する防御機構がそなわっており、一方、腫瘍細胞ではそれが無い、有ってもきわめて弱いことが推測された。さらに、この防御機構はTNF自身によって腫瘍細胞にも誘導され、TNFはその防御機構に打ち勝って腫瘍細胞を崩壊に導くという仮説が成り立つものと考えられた。

5 結 論

腫瘍細胞株及び正常2倍体線維芽細胞を対象とし、 ^{125}I 標識TNFを用いたbinding assayによりTNF receptor数の測定をおこない、TNF感受性との関係を検討した。

また、L-M細胞(TNF感受性腫瘍細胞)とHEL細胞(TNF非感受性正常2倍体線維芽細胞)を用い、pulse label及び細胞分画法によりTNFの細胞内への取り込みと細胞内分布について調べた。

さらに、TNFがRNA合成、蛋白合成に与える影響について検討し、以下の結果を得た。

(1) TNF感受性腫瘍細胞のみならず、正常2倍体線維芽細胞にもTNF receptorが存在し、Kd値はいずれの細胞でも 10^{-10}M オーダーで腫瘍細胞と差異はみられなかった。

(2) これら正常2倍体線維芽細胞では、TNFの細胞傷害性がみられないのみならず、逆にHET細胞では増殖刺激作用が認められた。

これらの結果より、TNF receptorの存在は、TNFが細胞傷害性を発揮する上で必要条件であるが十分条件とはいえなかった。

(3) 各種cytoskeletal disrupting agentの添加により、TNFの細胞傷害性は非添加時に較べ著明に阻害された。すなわち、TNFの細胞内への取り込みは、TNFが細胞傷害性を発揮する上で必要条件と思われた。

(4) また、 ^{125}I 標識TNFを用いたpulse label法で、L-M、HEL細胞を対象とし、TNFの細胞内への取り込みを調べたところ、12分後に取り込みのピークが認められ、120分後にはほとんどがdegradation productとして細胞外に放出され、両細胞間で差異は認めなかった。

(5) さらに、 ^{125}I 標識TNFの細胞内分布を細胞分画法で検討したところ、L-M、HEL細胞とも15分でlysosome分画に放射能量のピークが認められ、60分後

には消失していた。

以上の結果より、TNF receptorを保有する細胞では、その感受性の如何にかかわらず、receptor mediated endocytosis→lysosome→degradation→releaseというpathwayが存在することが示唆された。

(6) 各種lysosomotropic agentの添加により、TNFの細胞傷害性は抑制され、lysosomal enzymeがTNFによる細胞傷害性発現の一翼を担っていることが示唆された。

(7) TNF感受性腫瘍細胞では、TNF添加24時間後に、total RNA、mRNA、蛋白合成の増加のピークが認められたが、正常2倍体線維芽細胞では、これらの変化はみられず腫瘍細胞と著明な差異が認められた。

(8) さらに、L-M細胞をACD、CHIで処理し、RNA合成、蛋白合成を阻害すると、TNFの細胞傷害性が增強したことより、腫瘍細胞におけるRNA合成、蛋白合成の増加は、細胞傷害性の反応ではなく、逆に防御のメカニズム(防御機構)を反映している可能性が示唆された。

(9) 一方、HEL細胞において、ACD、CHIを共存させると、TNF単独ではみられなかった細胞傷害性が出現した。すなわち、正常細胞では常時防御機構が存在し、TNF抵抗性を獲得していることが推測された。

稿を終えるにあたり、御指導並びに御校閲を賜った本学内科学第4講座、漆崎一郎教授、新津洋司郎助教授に深謝いたします。また研究に際して御指導をいただいた本学内科学第4講座、渡辺直樹講師及び御協力いただきました教室員各位に感謝いたします。

文 献

1. Helson, L., Helson, C. and Green, S.: Effect of murine tumor necrosis factor on heterotransplanted human tumor. *Exp. Cell. Biol.* **47**, 53-60 (1979).
2. 新津洋司郎, 渡辺直樹, 漆崎一郎: 抗腫瘍性体液因子からみた癌の免疫療法—特にTumor Necrosis Factor (TNF)について—, *日本臨免学会誌* **6**, 417-425 (1981).
3. Watanabe, N., Niitsu, Y., Sone, H., Neda, H., Yamauchi, N. and Urushizaki, I.: Inhibitory effect of tumor necrosis serum on the metastasis of B-16 mouse melanoma cells. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **76**, 989-994 (1985).
4. Watanabe, N., Niitsu, Y., Neda, H., Sone, H., Yamauchi, N., Umetsu, T. and Urushizaki, I.: Antitumor effect of tumor necrosis factor against various primarily cultured human cancer cells.

- Jpn. J. Cancer Res. (Gann) **76**, 1115-1119 (1985).
5. Carswell, E., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B.: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 3666-3670 (1975).
 6. Matthews, N.: Tumor necrosis factor from the rabbit. II. Production by monocytes. Br. J. Cancer **38**, 310-315 (1978).
 7. Shirai, T., Yamaguchi, H., Todd, C. W. and Wallace, R. B.: Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumor necrosis factor. Nature **313**, 803-806 (1985).
 8. Penica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B. and Coeddel, D. U.: Human tumor necrosis factor: Precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. Nature **312**, 724-729 (1984).
 9. Wang, A. M., Creasey, A. A., Lander, M. B., Lin, L. S., Strickler, J., Van Arsdell, J. N., Yamamoto, R. and Mark, D. F.: Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. Science **228**, 149-154 (1985).
 10. 宗村庚修, 中野勝二, 阿部守一: 遺伝子組換えヒト TNF の抗腫瘍活性. 癌と化学療法 **12**, 160-162 (1985).
 11. Fransen, L., Mueller, R., Marmenout, A., Tavernier, J., Van der Heyden, J., Kawashima, E., Chollet, A., Tizard, R., Van Heuverswyn, H., Van Vliet, A., Ruysschaert, M. R. and Fiers, W.: Molecular cloning of mouse tumor necrosis factor cDNA and its eukaryotic expression. Nucleic Acids Res. **13**, 4417-4429 (1985).
 12. Ito, H., Yamamoto, S., Kuroda, S., Sakamoto, H., Kajihara, J., Kiyota, T., Hayashi, H., Kato, M., and Seko, M.: Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA coding for rabbit tumor necrosis factor. DNA **5**, 149-156 (1986).
 13. Beutler, B. A., Milsark, I. W. and Cerami, A.: Cachectin/tumor necrosis factor: Production, distribution, and metabolic fate *in vivo*. J. Immunol. **135**, 3972-3977 (1985).
 14. Kirstein, M. and Baglioni, C.: Tumor necrosis factor induces synthesis of two proteins in human fibroblasts. J. Biol. Chem. **261**, 9565-9567 (1986).
 15. Gamble, J. R., Harlan, J. M., Klebanoff, S. J. and Vadas, M. A.: Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 8667-8671 (1985).
 16. Stolpen, A. H., Guinan, A. E. C., Fiers, W. and Rober, J. S.: Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon act singly and in combination to recognize human vascular endothelial cell monolayers. Am. J. Pathol. **123**, 16-24 (1986).
 17. Nawroth, P. P. and Stern, D. M.: Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. J. Exp. Med. **163**, 740-745 (1986).
 18. Kunkel, S. L., Wiggins, R. C., Chensue, S. W. and Larrick, J.: Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E₂. Biochem. Biophys. Res. Commun. **137**, 404-410 (1986).
 19. Brondy, V. C., Kaushansky, K., Segal, G. M., Harlan, J. M. and Adamson, J. W.: Tumor necrosis factor type α stimulates human endothelial cells to produce granulocyte/macrophage colony stimulating factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 7467-7471 (1986).
 20. 根田 寛: 腫瘍細胞における Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor の解析. 札幌医誌 **56**, 305-317 (1987).
 21. Yamazaki, S., Onishi, E., Enami, K., Natori, K., Kohase, M., Sakamoto, H., Tanouchi, M. and Hayashi, H.: Proposal of standardized methods and reference for assaying recombinant human tumor necrosis factor. Jpn. J. Med. Sci. Biol. **39**, 105-118 (1986).
 22. Bolton, A. E. and Hunter, W. M.: The labeling of proteins to high specific radioactivities by conjugating to a ¹²⁵I-containing acylating agent: application to the radioimmunoassay. Biochem. J. **133**, 529-538 (1973).
 23. Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. NY Acad. Sci. **51**, 660-672 (1949).
 24. Yonehara, S., Ishii, A. I. and Yonehara-Takahashi, M.: Cell surface receptor-mediated internalization of interferon: its relation to the anti-viral activity of interferon. J. Gen. Virol. **64**, 2409-2418 (1983).
 25. Miskimins, W. K. and Shimizu, N.: Dual pathways for epidermal growth factor processing after receptor-mediated endocytosis. J. Cell. Physiol. **112**, 327-338 (1982).
 26. Walter, K. and Schutt, C.: Acid and alkaline phosphatase in serum (Two point method) Method of Enzymatic Analysis. 2nd ed., vol. 2

- (ed. by Bergmeyer, H. U.). 856-860, Academic Press, (1974).
27. Barrett, A. J.: A new assay for Cathepsin B1 and other thiol proteinase. *Anal. Biochem.* **47**, 280-293 (1972).
 28. Ostrove, J. M. and Gifford, G. E.: Stimulation of RNA synthesis in L-929 cells by rabbit tumor necrosis factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **160**, 354-358 (1979).
 29. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Rutter, W. J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-5299 (1979).
 30. Aviv, H. and Leder, P.: Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acidcellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1408-1412 (1972).
 31. Onodera, Y., Reilly, E. B. and Eisen, H. N.: Synthesis of light chain subtypes by stimulated and unstimulated mouse B cells. *Eur. J. Immunol.* **13**, 739-746 (1983).
 32. Kane, A. B., Young, E. E., Schanne, F. A. X. and Farber, J. L.: Calcium dependence of Phalloidin-induced liver cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2**, 1177-1180 (1980).
 33. Carpenter, G. and Cohen, S.: ¹²⁵I-labeled human epidermal growth factor: Binding, internalization and degradation in human fibroblast. *J. Cell Biol.* **71**, 159-171 (1976).
 34. 佐々木實: 蛋白分解酵素阻害剤. *生体の科学* **35**, 603-613 (1984).
 35. Steel, G. G. and Peckham, M. J.: Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: The concept of additivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **5**, 85-91 (1979).
 36. Kull, F. C., Jr., S. Jacobs, Jr. and Cuatrecasas, P.: Cellular receptor for ¹²⁵I-labeled tumor necrosis factor: specific binding, affinity labeling and relationship to sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5756-5760 (1985).
-
- 別刷請求先:
(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学内科学第4講座 曾根久雄