

腫瘍内浸潤リンパ球の機能的解析

伊 林 至 洋

札幌医科大学脳神経外科学講座 (主任 端 和夫 教授)

上 出 利 光

札幌医科大学病理学第1講座 (主任 菊地浩吉 教授)

Functional Analysis of Lymphocytes Infiltrating into Tumors Undergoing Rejection

Yukihiko IBAYASHI

Department of Neurosurgery, Sapporo Medical College
(chief : Prof. K. Hashi)

Toshimitsu UEDE

Department of Pathology (Section 1), Sapporo Medical College
(chief : Prof. K. Kikuchi)

Subcutaneous injection of 10^7 syngeneic gliosarcoma (T-9) cells is enough to kill Fisher rats within 2 months. Fisher rats can be induced to have a resistance to T-9 cells by surgical removal of the tumor and repeated immunization of MMC-treated T-9 cells. Histopathological analysis of implanted T-9 tumor tissue revealed a massive accumulation of mononuclear cells in the tumor tissues of immune rats which were rejecting syngeneic T-9 tumors, whereas very few mononuclear cells were found in the tumor tissues of non-immune rats. Mononuclear cells found within the regressing tumor of immune rats were identified mostly to be T cells and two-thirds of these T cells were Ly2 positive and very few macrophages, B cells and T cells with the helper phenotype were found. In contrast, only a few mononuclear cells were found within the growing tumor in non-immune rats. They were identified to be a mixture of macrophages and T cells and a few Ly2 positive cells.

Cytofluorographic analysis of infiltrating mononuclear cells demonstrated that a subpopulation of separated cells reflected histopathological patterns of various cell populations in situ.

These mononuclear cells were found to be cytotoxic against T-9 cells, whereas splenocytes and PBL from the same immune rats did not show cytotoxicity against T-9 cells in terms of ^{51}Cr release assay.

The results in *in vitro* ^{51}Cr release assay was confirmed by Winn assay showing that the tumor was rejected only when T-9 cells were implanted into normal Fisher rats along with lympho-

Abbreviations:

Con A : concanavalin A
CTL : cytotoxic T cell
DTH : delayed type hypersensitivity
FACS : Fluorescein Activated Cell Sorter
FCS : fetal calf serum
IL-2 : Interleukin-2
LAK : lymphokine-activated killer cell
MΦ : macrophage

MCDF : MΦ derived cytotoxic T cell differentiation factor
MLC : mixed lymphocyte culture
MLTC : mixed lymphocyte tumor cell culture
MMC : mitomycin C
NK : natural killer
PBL : peripheral blood lymphocytes
PBS : phosphate-buffered saline
PHA : Phytohemagglutinin
TIL : tumor infiltrating lymphocytes

cytes from a regressing tumor of immune rats. Cell depletion studies revealed that Ly2 positive cells were important for rejecting tumor cells.

(Received November 15, 1984 and accepted December 10, 1984)

Key words: Tumor infiltrating lymphocytes (TIL), CTL, Interleukin-2 (IL-2), Immunotherapy

1 緒 言

古くから人癌組織中にリンパ球浸潤が観察され、その浸潤の程度と患者の予後とが密接に関係しているとの報告がある。最初の報告は1907年 Handley¹⁾の悪性黒色腫例とされる。Black *et al.*^{2,3)}は胃癌等の症例でリンパ球浸潤と5年生存率に相関があると報告している。胃癌ばかりでなく乳癌⁴⁾、喉頭癌⁵⁾やneuroblastoma^{6,7)}等の症例でリンパ球浸潤が観察され、しかも組織学的には悪性でもリンパ球浸潤を伴う症例では予後が良いことも明らかにされてきた⁸⁾。さらにヒトリンパ球に対する異種抗血清の開発により、当時の形態学的なリンパ球の同定からT細胞、B細胞の識別が可能となり、癌組織内浸潤リンパ球はT細胞が多く、一方良性疾患でみられるリンパ球はB細胞が多いことも明らかにされてきた^{9,10)}。

近年ハイブドーマを利用した単クローン抗体により¹¹⁻¹³⁾、より詳細にリンパ球亜群の識別が可能となり、腫瘍内浸潤リンパ球の意義についても新しく見直されてきた。

当教室の口腔癌における検索では、ヒト舌癌組織間質にはB細胞はほとんどなく、大部分はkiller/suppressorのphenotypeのT細胞が浸潤していた。そしてT細胞の浸潤の程度と癌の進展度、リンパ節転移とは有意に相関することを示した^{14,15)}。

しかし腫瘍内に浸潤しているリンパ球の機能的解析を行った報告はない。

今回我々はFisherラット由来gliosarcoma (T-9)細胞を用い、免疫あるいは非免疫動物の腫瘍内浸潤リンパ球を分離し、その機能的意義について詳しく比較検討し、またInterleukin-2 (IL-2)を用いてこうしたリンパ球を長期培養することにより治療実験への可能性も得たので報告する。

2 実験方法

2.1 実験動物

実験にはFisher系雌ラット(体重200~250g)を使用し、標準飼料(オリエンタル酵母社)と水を自由に与えた。

2.2 腫瘍培養株

名古屋大学脳神経外科吉田博士より供給されたN-nitrosourea誘発Fisherラット由来gliosarcoma細胞(T-9細胞)を用いた¹⁶⁾。T-9細胞は5%FCS加RPMI1640培養液で継代されている。使用に際しては壁密着性のT-9細胞をtrypsin (Sigma) 0.02%で10分間処理し、PBSで2回洗浄した後に5%FCS加RPMI1640培養液で4時間37°C5%CO₂培養器で培養し、Trypan-blueでviabilityを確認した後に使用した。

また国立衛生試験場萩生博士より供給された二種類の1-Propyl-1-nitrosourea誘発Fisher由来Thymic lymphoma FTL-13, FTL-43を用いた¹⁷⁾。FTL-13, FTL-43は腹水型腫瘍であり、同系Fisherラット腹腔内で継代されている。

2.3 腫瘍増殖曲線の作製と免疫方法

T-9細胞を1×10⁶個、5×10⁶個、1×10⁷個をそれぞれFisherラット背部に皮下注射し、2日ごとに腫瘍の直径をノギスで測定した。1×10⁷個を接種した場合、Fisherラットは約2カ月で腫瘍死した。また腫瘍の自然消退は全く認められなかった。

免疫方法は外科的切除法によった。すなわち1×10⁷個のT-9細胞をFisherラット背部に皮下注射し、10日後に腫瘍の直径が約1cmに増大した時に外科的に腫瘍を切除し初回免疫した。以後一週間ごとに5×10⁶/mlに浮遊させたT-9細胞に対し25μg/mlのマイトマイシンC(MMC, 協和醸酵)で37°C1時間処理をしたT-9細胞を2×10⁷個Fisherラット背部に皮下注射する処置を数回加え、免疫を成立させた。

2.4 使用した抗体

抗ラット単クローン抗体として、教室のMatsuura *et al.*^{18,19)}が作製したR1-3B3, R1-10B5, R2-1A6その他を用いた。R1-3B3はラットのT細胞マーカーであり、またR2-1A6はラットのMΦと一部顆粒球に発現する。ラットkiller/suppressor T細胞に対応する単クローン抗体としてR1-10B5¹⁹⁾またはOX-8²⁰⁾, helper/inducer T細胞に対応する単クローン抗体としてはW3/25²¹⁾(Sera-Lab)を用いた。

R1-3B3は正常ラットT細胞の98%, OX-8 (R1-

10B5)は30%またW3/25は70%に発現することが知られている¹⁹⁾。使用に際しては抗マウスIgのラットIgに対する交叉反応性を除去するために、各抗体を正常ラット血清を含んだSephrose 2-Bカラムを通してから使用した²²⁾。

その他FITC conjugated rabbit anti-rat Ig, FITC conjugated goat anti-mouse Ig (Meloy Lab), avidin+biotin-peroxidase conjugate (Miles Lab), biotinylated goat anti-mouse Ig (Vector Lab)を使用した。

2.5 腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) の調整

免疫を獲得したFisherラット背部に 1×10^7 個のT-9細胞を皮下注射し、腫瘍が拒絶されつつある5~6日目の腫瘍組織を無菌的に取り出した。腫瘍組織をはさみで微細片化し、5% FCS加RPMI 1640培養液に浮遊させ37°C 5%CO₂培養器で4時間培養した。T-9細胞はシャーレの底に密着するので上清を取り、PBSで洗浄することにより腫瘍組織から遊離してきたリンパ球を得た。さらにFicoll-Conray法²³⁾(比重, 1.096)により生細胞のみとした。腫瘍細胞の混入は1%以下であった。

2.6 TILの免疫組織学的検索

2.6.1 酵素抗体法

腫瘍組織の小片を液体窒素で凍結後クライオスタットで4 μ mの厚さに薄切し、冷アセトン液で4°C10分間反応させ固定した。冷PBSで30分間洗浄した後、各種単クローン抗体(R1-3B3, R2-1A6, OX-8, W3/25, rabbit anti-rat Ig)を室温で45分間反応させ、さらに冷PBSで30分間洗浄した後biotinylated goat anti-mouse Igを反応させた。冷PBSで30分間洗浄後avidin+biotin peroxidaseを反応させた²⁴⁾。冷PBSで30分間洗浄した後peroxidase反応基質液(0.01% H₂O₂加3.3'-5.5'-diaminobenzidine tetrahydrochloride飽和液, pH 7.6)中で発色させた²⁵⁾。発色後冷PBSで洗浄し、0.2%メチルグリーン溶液で核染色し、脱水、透徹後Bioleitで封入し観察に供した。

2.6.2 FACS analyzerによる解析

1×10^6 個のTILをpelletにし、各種単クローン抗体, R1-3B3, R2-1A6, OX-8, W3/25をそれぞれ適切な濃度として30 μ lずつ加え4°C45分間反応させた。冷PBSで2回洗浄した後に、FITC conjugated goat anti-mouse Igを30 μ lずつ加え4°Cで30分間反応させた。s-Igの検出に関してはFITC conjugated rabbit anti-rat Igを使用した。PBSで2回洗浄した後に0.5%ホルマリンバッファーで固定しFACS analyzer

(Becton-Dickinson)のsampleとした。

2.7 ⁵¹Crを用いた細胞障害試験

1×10^7 個のT-9細胞, ヒトのerythroleukemia細胞株であるK562をそれぞれ1mlのRPMI1640培養液に浮遊させ、100 μ Ciの⁵¹Cr sodium chromate (Amersham)を加え37°C 5%CO₂培養器で90分間反応させた。ラベル後数回PBSで洗浄した後に10% FCS加RPMI1640培養液で 1×10^5 /mlの濃度に再浮遊させた。

100 μ lのtarget cell (T-9細胞, K562)と100 μ lのeffector cellをE/T ratioが100:1, 50:1, 25:1となるようにそれぞれtriplicateで96-well round-bottomed microtiter plateに入れ、600rpm5分間の遠心後37°C 5% CO₂培養器で16時間培養した。培養後2,000 rpm 10分間の遠心後上清を100 μ lずつ得、遊離したアイソトープをLKB multigamma 1260 gamma counterで測定した。コントロールとしてeffector cellの代わりに10% FCS加RPMI1640培養液を100 μ l加えたものをspontaneous releaseとし、4% Lubrol溶液を加えたものをmaximum releaseとした。Effector cellのコントロール群としては免疫動物の脾細胞, PBL, 非免疫動物のTILを用いた。またT-9細胞接種後2, 4, 6日目の免疫動物の脾細胞, PBLも使用した。

% specific lysisは以下の式で求めた。

$$\% \text{ specific lysis} = \frac{\text{mean experimental cpm} - \text{mean spontaneous cpm}}{\text{mean maximum cpm} - \text{mean spontaneous cpm}} \times 100$$

なおcold target inhibition assay時には、コールドのT-9細胞, FTL-13, FTL-43, Fisher胸腺細胞, K562をinhibitorとしてT/I ratio 1:50で行なった。

2.8 Cell depletion assay

OX-8陽性細胞, W3/25陽性細胞の除去にはpanning法²⁶⁾にて行なった。 2×10^7 個のTILに十分量のOX-8あるいはW3/25を加え4°Cで1時間反応させた。冷PBSで2回洗浄した後にあらかじめanti-mouse Igでコーティングしていたtissue culture diskに静かに浮遊させ、4°Cで1時間反応させた。非密着細胞を回収し冷PBSで洗浄した後にOX-8あるいはW3/25 depleted fractionとして使用した。

2.9 Winn試験

T-9細胞とTILをそれぞれ 2×10^5 /ml, 4×10^5 /mlにPBSで浮遊させ、各々0.5mlずつを正常Fisherラット背部に皮下注射し、腫瘍の直径を2日ごとにノギスで測定した。コントロール群としてPBS, 免疫動

物の脾細胞, 非免疫動物の脾細胞を用いた。

2.10 T-T hybridoma による IL-2 の作製

近年 Interleukin-2 (IL-2) を用いて種々の CTL の長期培養が可能となってきた^{27,28)}。また CTL の機能は多くのリンホカインによって制御されていることも明らかにされつつある^{29,30)}。我々は他のリンホカインの含有のできるだけ少ない IL-2 を得る目的で T-T hybridoma を Huff *et al.*³¹⁾ の方法に準じて行なった。

6~8 週齢の雌 Lewis ラットの脾細胞を 10% FCS, 5×10^{-5} M2-mercaptoethanol, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン, 100u/ml ペニシリン加 RPMI 1640 培養液に $5 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度で浮遊させ, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Concanavalin A (ConA, Sigma grade III) の存在下で 37°C 5% CO₂ 培養器で 48 時間培養した。培養後の 1×10^8 個の Con A blast 脾細胞と 5×10^7 個の HPRT deficit AKR thymoma cell (BW5147) を Köhler and Milstein¹¹⁾ の方法に準じてポリエチレングリコール (M. W. 4,000 和光純薬) 存在下に細胞融合させた。BALB/c マウス脾細胞を feeder として加え, 10% FCS 加 HAT 培養液で一週間培養し, 融合細胞のみを選択した。10% FCS 加 HT 培養液を用いて培養液交換をくり返し, 融合細胞が増殖してきた well の培養上清をスクリーニングした。

hybridoma のスクリーニングは一次として BALB/c mouse thymocyte co-stimulation assay を用いた³²⁾。二次スクリーニングとして IL-2 dependent CTL を用いた³³⁾。

hybridoma の産生した IL-2 の unit は Stadler and Oppenheim³⁴⁾ の方法に準じ以下の式により求めた。

$$\text{units} = \frac{\text{test titer}}{\text{standard titer}} \times 100$$

2.11 TIL の長期培養

TIL を IL-2 産生 hybridoma を用いて 3 カ月間培養し, T-9 細胞に対するキラー活性の測定と Winn 試験を行なった。方法は 2.7, 2.9 と同様である。

3 成 績

3.1 非免疫 Fisher ラットと免疫を獲得した Fisher ラットでの T-9 腫瘍の増殖曲線

1×10^6 個, 5×10^6 個, 1×10^7 個の T-9 細胞を正常 Fisher ラット背部に皮下注射し, 腫瘍の直径を 2 日ごとにノギスで測定した (Fig. 1 a)。

腫瘍の直径は 1×10^7 個接種した場合, 7 日目で 8.6 ± 0.5 mm 9 日目で 10 ± 0.4 mm と増大していき約 2 カ月で全例腫瘍死した。

外科的切除で初回免疫し, 以後 MMC で処理をした

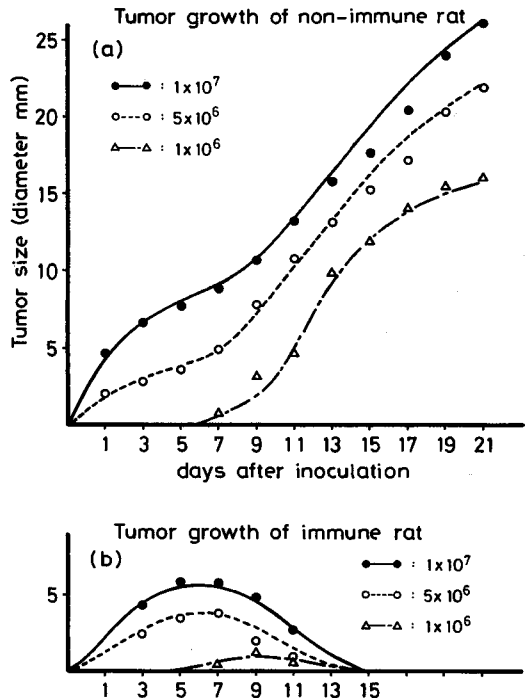


Fig. 1 Tumor growth in non-immune (a) or immune (b) rats. One million, 5×10^6 , or 1×10^7 viable T-9 cells were inoculated into non-immune or immune syngeneic Fisher rats. Tumor growth was measured every 2 days. The sizes of eight inoculated tumors in eight rats were plotted together with the mean.

T-9 細胞で数回 booster をかけて免疫を獲得した Fisher ラットでは (Fig. 1b), 腫瘍の直径は 1×10^7 個の T-9 細胞を接種した場合 5~7 日目で 6.1 ± 0.5 mm と最大となるが, やがて縮小していき 15 日目で完全に消失した。

この系で腫瘍の自然消退はみられず, また統計学的処理のため各群共 6 匹以上の Fisher ラットを使用して行なった。

3.2 拒絶時の腫瘍組織の免疫組織学的解析

間接蛍光抗体法により, 腫瘍を完全に拒絶するようになった Fisher ラットの血中抗体価を検索したが, 抗体価の上昇はみられなかった。

Fig. 2 は Fisher ラット背部に 1×10^7 個の T-9 細胞を皮下注射し, 10 日目に腫瘍の直径が約 1cm になった時の腫瘍組織の Hematoxylin-Eosin (HE) 像ならびに各種単クローン抗体を用いた酵素抗体法による像である。HE 像(a)では大小不同で時に mitosis のみられる核を持つ結合組織誘導の強い腫瘍細胞が認められる。腫瘍

内に浸潤しているリンパ球の数は非常に少ない。(b)~(f)はそれぞれ Ly1 陽性細胞, OX-8 陽性細胞, W3/25 陽性細胞, MΦ, s-Ig 陽性細胞を示しているが, Ly1⁺つ

まり T 細胞の数はそれ程多くなく, またその中で Ly2⁺つまり killer/suppressor の T 細胞は少ない. それに対して MΦ の占める割合が多くなっている. s-Ig 陽性細

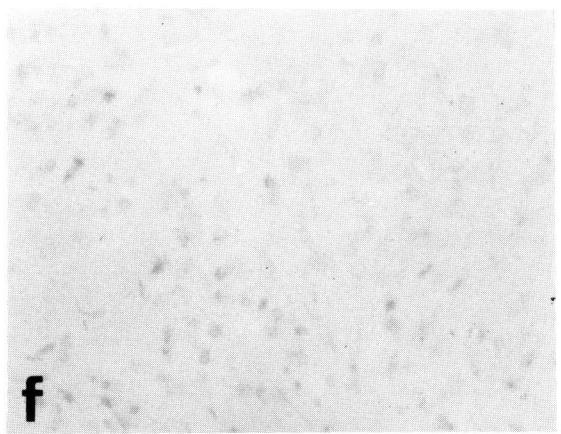
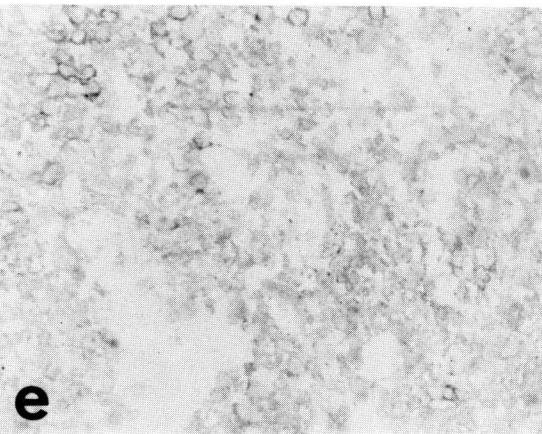
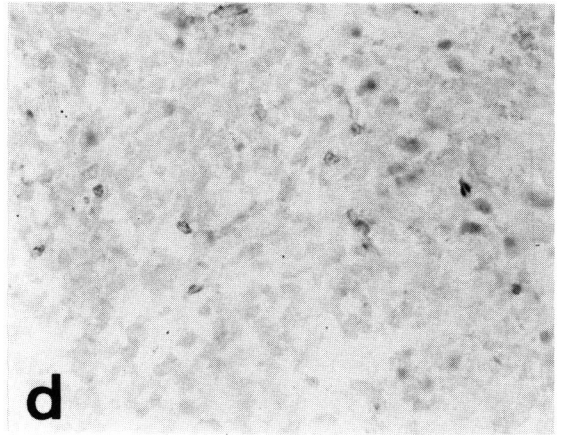
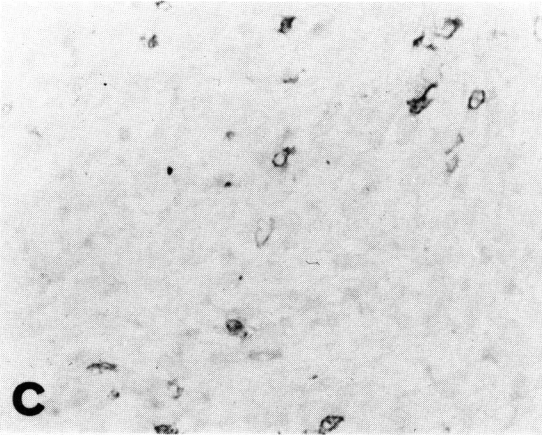
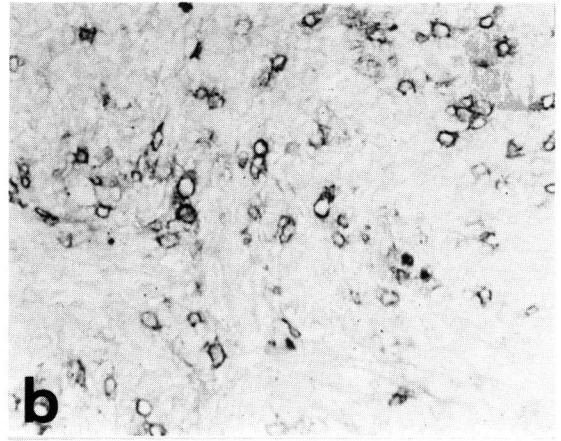
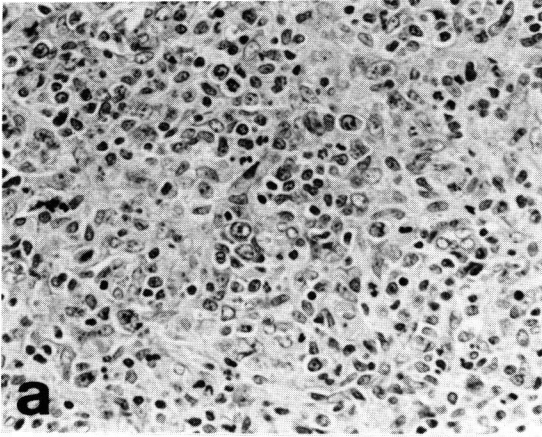


Fig. 2 Immunohistological analysis of tumor tissues from non-immune rats. Hematoxylin-Eosin $\times 112$ (a). TIL were stained by immunoperoxidase techniques with R1-3B3 (b), OX-8 (c), W3/25 (d), R2-1A6 (e) and surface Ig (f). A few OX-8 positive cells were stained. ($\times 112$)

胞は認められない。

Fig. 3 は免疫を獲得した Fisher ラットに 1×10^7 個の T-9 細胞を皮下注射し、腫瘍の拒絶の起きている 6 日

目の腫瘍組織の HE 像ならびに各種単クローン抗体による酵素抗体法の像である。

HE 像(a)では非免疫の場合と比較して、非常に多くの

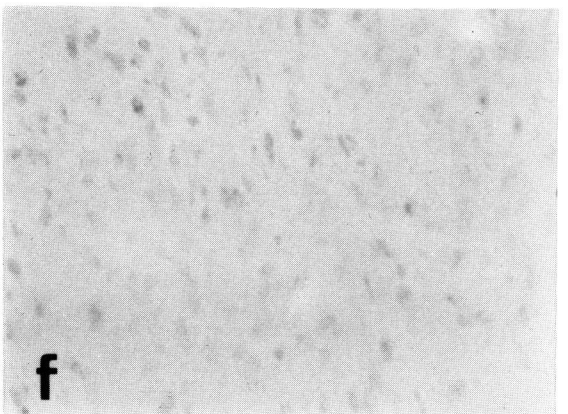
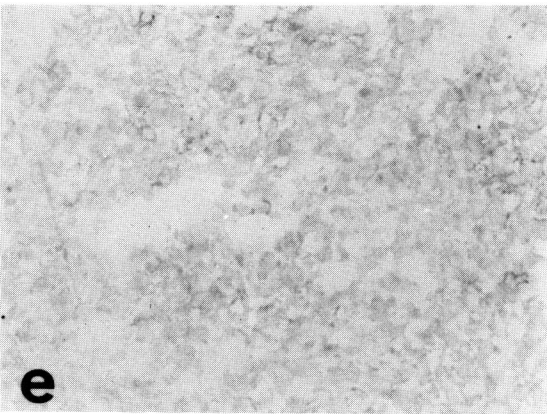
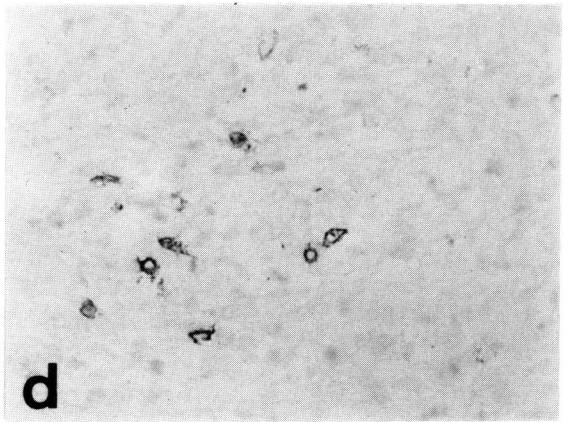
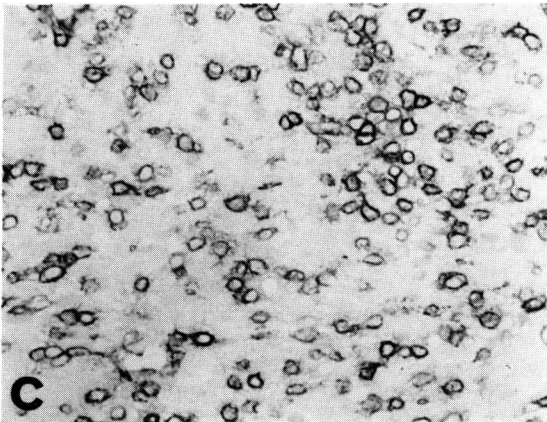
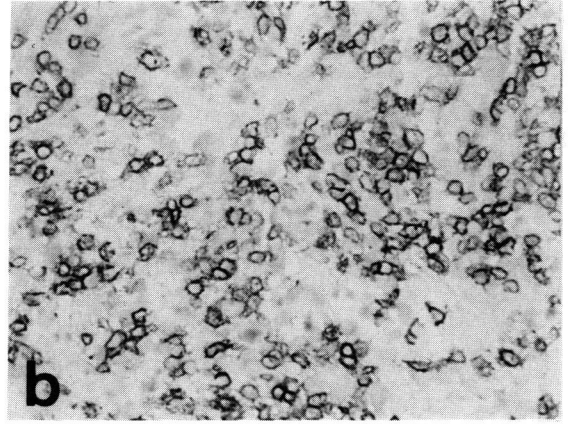
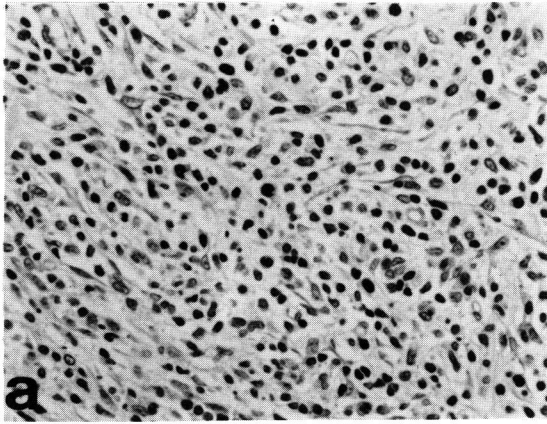


Fig. 3 Immunohistological analysis of tumor tissues from immune rats. Hematoxylin-Eosin $\times 112$ (a). TIL were stained by immunoperoxidase techniques with R1-3B3 (b), OX-8 (c), W3/25 (d), R2-1A6 (e) and surface Ig (f). The majority of TIL were stained with R1-3B3 and OX-8. ($\times 112$)

リンパ球浸潤がみられ、腫瘍は一部壊死に陥っている。酵素抗体法では Ly1 陽性細胞(b)がほとんどを占め、その中でも OX-8 陽性細胞(c)が半数以上を占めている。それに対して W3/25 陽性細胞(d), MΦ(e)は数%以下と非常に少なかった。s-Ig 陽性細胞(f)は認められなかった。

3.3 TIL の FACS analyzer による解析

TIL は 1×10^7 個の T-9 細胞を非免疫あるいは免疫を獲得した Fisher ラット背部に接種し 6 日目の腫瘍塊各々 20 個から得た。まず大きな差異は非免疫 Fisher ラットの TIL は腫瘍組織 1g 当り 4×10^4 個しか得られなかったのに対し、免疫を獲得した Fisher ラットの

TIL は腫瘍組織 1g 当り $1 \sim 5 \times 10^6$ 個と非常に増加していた。

Fig. 4 は FACS analyzer による TIL の解析であるが、非免疫 Fisher ラットの TIL は 55% が T 細胞であり(a), OX-8 陽性細胞は 25% 以下(b), MΦ は 25%(c)と MΦ の占める割合が多かった。またこのことは酵素抗体法の結果と一致するものであった。これに対して免疫を獲得した Fisher ラットの TIL は 78% が T 細胞であり(d), 41% が OX-8 陽性細胞であった(e)。MΦ (f), W3/25 陽性細胞は数%以下であった。腫瘍を完全に拒絶するようになった Fisher ラットの TIL では、質的に

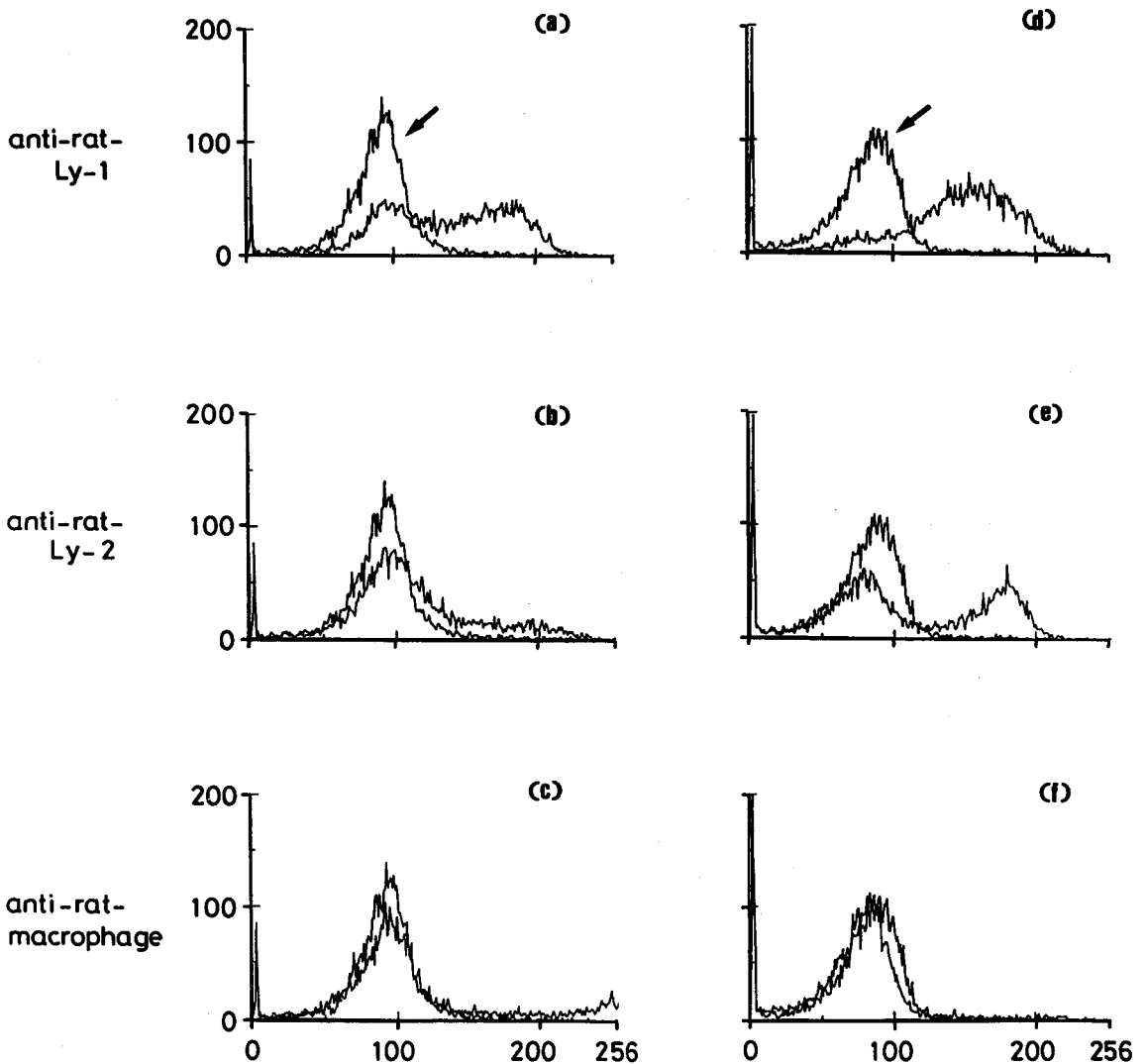


Fig. 4 Cytofluorographic analysis of TIL from non-immune (a to c) and immune (d to f) rats, which were stained by immunofluorescence with R1-3B3, OX-8 and R2-1A6. Control specimens (arrow) were made with control NS-1 culture supernatant.

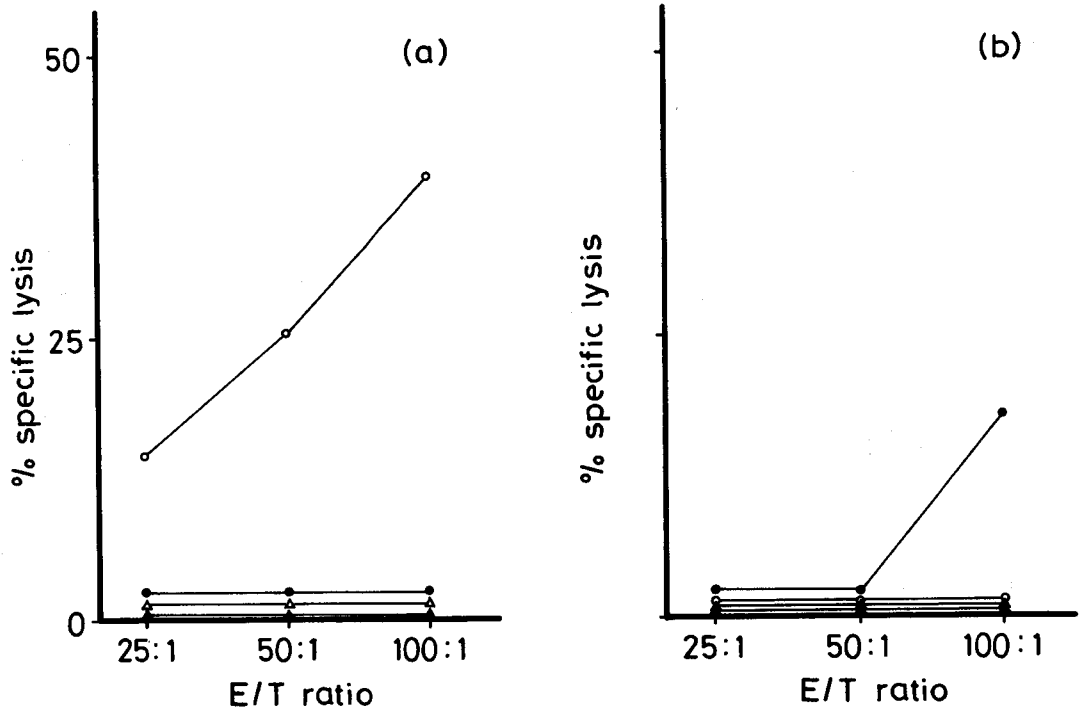


Fig. 5 Cytolytic activity of TIL, splenocytes and PBL from immune rats and TIL from non-immune rats against T-9 cells (a) and K562 cells (b). TIL (○-○), splenocytes (●-●) and PBL (△-△) from immune rats and TIL (▲-▲) from non-immune rats were cultured with 1×10^4 ^{51}Cr labeled target cells for 16 hrs at 37°C. The values are expressed as the percentage of the specific chromium release.

も量的にも Lyl^+ , OX-8^+ の T 細胞が増加していることが示された。

3.4 TIL の T-9 細胞に対するキラー活性

3.4.1 Direct killer activity

次に腫瘍内に増加している TIL が実際に T-9 細胞に対してキラー活性を有しているのかを、まず *in vitro* で ^{51}Cr sodium chromate を使用して検索した (Fig. 5). まず免疫を獲得した Fisher のラットの TIL の % specific lysis は 25:1 で 14.1%, 50:1 で 25.7%, 100:1 で 38.8% と dose dependent に増加していた。

同時に測定した K562 を target cell とした NK 活性は認められなかった。同じ免疫を獲得した Fisher ラットの脾細胞、PBL では、脾細胞で NK 活性が E/T ratio 100:1 で 18.1% と軽度みられたが、いずれも T-9 細胞に対するキラー活性を認めなかった。非免疫動物での TIL は T-9 細胞に対しても K562 に対してもキラー活性を認めなかった。

3.4.2 T-9 細胞接種後 2 日目、4 日目、6 日目の脾細胞、PBL のキラー活性

Table 1 のごとく免疫を獲得した Fisher ラットに T-9

Table 1 Killer activity of splenocytes & PBL from immune rats at 2 days, 4 days & 6 days after inoculation of T-9 cells

Target cells	Effector cells	E/T ratio	% specific lysis ^{a)}		
			2 days	4 days	6 days
T-9	splenocytes	100:1	0	0	0
	PBL	100:1	0	12.3±1.5	0
K562	splenocytes	100:1	28.0±0.9	40.5±0.1	18.1±1.9
	PBL	100:1	4.8±0.6	38.8±4.4	0

a) Values are expressed as mean ± SEM of five separate experiments.

細胞を接種し、2~6日目の脾細胞、PBLのT-9細胞に対するキラー活性はPBL 4日目で12.3%と一過性にみられた他に検出されなかった。NK活性については脾細胞、PBL共に4日目にそれぞれ40.5%、38.8%とピークになり拒絶の最盛期である6日目には減少していた。

3.4.3 Cold target inhibition assay

次にこのTILのT-9細胞に対するキラー活性の特異性を検索した(Fig. 6)。Inhibitorを加えない時のTILのT-9細胞に対する% specific lysisを100%とする

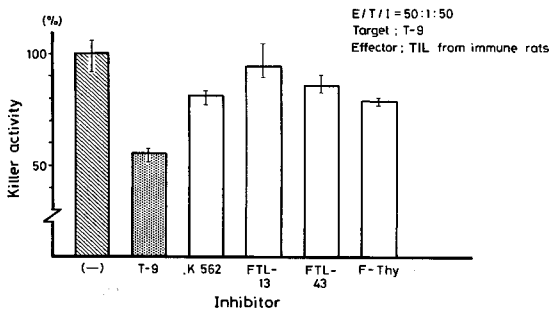


Fig. 6 Cold target inhibition by various syngeneic cells of cytotoxic activity of TIL against T-9 cells. The values are expressed as the percentage of cytotoxic activity of TIL against T-9 cells.

と、inhibitorとしてT-9細胞を加えるとキラー活性は54.3%に減少した。抑制率としては46%であった。同様にK562, FTL-13, FTL-43, Fisher胸腺細胞をinhibitorとして加えるとキラー活性は各々、79.6%、92.7%、84.8%、78.8%とまた抑制率で表わすと20%、7%、15%、21%であった。このことはTILのT-9細胞に対するキラー活性はT-9細胞に対して特異であることを強く示唆している。

3.5 Cell depletion assay

TILのT-9細胞に対するキラー活性が、今まで示したLyl⁺OX-8⁺のT細胞の増加と一致するかどうかを検索した(Table 2)。E/T ratio 25:1でTILのT-9細胞に対する% specific lysisは32.2%であった。このTILをOX-8, W3/25で処理しそれぞれのdepleted fractionを作製しT-9細胞に対する% specific lysisを求めると各々15.5%、37.9%であった。

このことはTILのT-9細胞に対するキラー活性にはLyl⁺OX-8⁺のT細胞が重要であることを示唆している。

3.6 Winn 試験

*in vivo*でのTILのT-9細胞に対するキラー活性を検索する目的でWinn試験を行なった(Table 3)。1×10⁵個のT-9細胞と2×10⁵個のTILをFisherラット

Table 2 Participation of OX-8⁺ T cells as cytotoxic cells against T-9 cells

Target cells	Effector cells	E/T ratio	% specific lysis ^{a)}
T-9	TIL	25:1	32.2±1.2%
	OX-8 treatment	25:1	15.5±0.2% ^{b)}
	W3/25 treatment	25:1	37.9±2.4%

a) Values are expressed as mean ± SEM of five separate experiments.

b) Value is significantly different from that of control (p<0.01).

The statistical significance of differences was calculated by using student's t-test.

Differences were considered significant when p<0.01.

Table 3 Winn assay

1×10 ⁵ T-9 cells were inoculated into normal Fisher rats along with 2×10 ⁵ of	Tumor size±SEM ^{a)} at 24 days after inoculation
PBS	3.1±0.4 mm
splenocytes from normal Fisher rats	2.3±0.5 mm
splenocytes from immune Fisher rats	5.0±0.8 mm
TIL from immune Fisher rats	1.0±0.4 mm ^{b)}

a) Values are expressed as mean ± SEM of four separate experiments.

b) Value is significantly different from that of control (p<0.01).

The statistical significance of differences was calculated by using student's t-test.

Differences were considered significant when p<0.01.

背部に接種し2日ごとに腫瘍の直径を測定した。24日目の腫瘍の直径は 1.0 ± 0.4 mmであった。コントロール群としてPBS, 正常ラット脾細胞, 免疫を獲得したラットの脾細胞を用いたが, 各々 3.1 ± 0.4 mm, 2.3 ± 0.5 mm, 5.0 ± 0.8 mmと有意に($P < 0.01$) TILの腫瘍増殖抑制効果がみられた。

3.7 IL-2 産生 hybridoma の unit 数

Table 4のごとくBALB/c胸腺細胞を用いての 3H thymidineのuptakeはcontrolで 523 ± 18 cpm, IL-2産生 hybridomaで 6297 ± 50 cpm, 30% IL-2で 2339 ± 3.5 cpmであった。Stadler and Oppenheim³⁴⁾の方法でunit数を求めると384.6 unitsとなる。

3.8 長期培養 TIL の T-9 細胞に対するキラー活性と Winn 試験

Table 5のごとくIL-2産生 hybridomaを用いて3カ

Table 4 BALB/c thymocyte's responses against T cell stimulators (3H thymidine cooperation)

T cell stimulators	T cell response (cpm) ^{a)}
10% FCS medium	523±18
IL-2 producing hybridoma	6,297±50
30% IL-2 medium	2,339± 3.5

a) Values are expressed as mean \pm SEM of six separate experiments.

Table 5 Killer activity of long term cultured TIL against T-9 cells

Target cells	Effector cells	E/T ratio	% specific lysis ^{a)}
T-9	long term cultured TIL	25 : 1	14.0±0.5%
		50 : 1	18.2±4.3%
		100 : 1	19.4±0.6%
K 562	long term cultured TIL	25 : 1	0
		50 : 1	0
		100 : 1	0

a) Values are expressed as mean \pm SEM of six separate experiments.

Table 6 Winn assay

1×10 ⁵ T-9 cells were inoculated into normal Fisher rats along with 2×10 ⁵ of	Tumor size±SEM ^{a)} at 24 days after inoculation
PBS	3.1±0.4 mm
splenocytes from normal Fisher rats	2.3±0.5 mm
long term cultured TIL	0.8±0.4 mm ^{b)}

a) Values are expressed as mean \pm SEM of four separate experiments.

b) Value is significantly different from that of control ($p < 0.01$).

The statistical significance of differences was calculated by using student's t-test. Differences were considered significant when $p < 0.01$.

月間培養したTILのT-9細胞に対するキラー活性はE/T ratio 25 : 1で14.0%, 50 : 1で18.2%, 100 : 1で19.4%とみられた。同時に測定したNK活性は認められなかった。また長期培養したTILのFACS analyzerによる解析も同時に行なったが, Lyl陽性細胞が63.4%, OX-8陽性細胞が56.6%とOX-8陽性細胞の占める割合が増加していた。

Winn試験では(Table 6)コントロール群と比較して著明な($P < 0.01$)腫瘍増殖抑制効果を認めた。

4 考 察

4.1 腫瘍内浸潤リンパ球の意義

4.1.1 腫瘍内浸潤リンパ球に関する従来の報告

癌組織に対する宿主側の免疫反応があるとすれば, それはいかなる場所において最も強く発現するであろうか。古くから局所リンパ節の組織学的構築の変化および癌組織内浸潤リンパ球の有無が予後との関係で注目されてきた。Black *et al.*²⁾は胃癌において原発癌組織間質にリンパ球浸潤がみられる程, また所属リンパ節のsinus histiocytosisの程度及びfollicular hyperplasiaが強くみられる程予後が良いと報告している。ま

た乳癌においても原発巣の組織型が高分化で原発癌組織内浸潤リンパ球の程度が強く、また所属リンパ節の sinus histiocytosis がみられる程予後が良いと報告している³⁾。同様の所見は喉頭癌⁵⁾、neuroblastoma^{6,7)}等でも観察され決して限られた癌組織だけにおきるものではないことが知られてきた。

4・1・2 腫瘍内浸潤リンパ球の亜群と臨床病態との関連

次にこうしたリンパ球の浸潤あるいはリンパ節の構造変化は果して担癌生体の免疫応答の一つなのであろうか。それとも単に癌組織に付随する現象なのであろうか。近年ハイブドローマを利用した単クローン抗体の開発によりリンパ球亜群の識別が可能となり、腫瘍内浸潤リンパ球もその機能と関連して検索されるようになってきた。Shimokawara *et al.*¹⁰⁾は良性疾患にはB細胞がしかし乳癌にはT細胞の浸潤がみられ、臨床病期、リンパ節転移の有無、癌組織型との間に相関があると報告している。Hiratsuka *et al.*^{14,15)}は口腔癌において、癌組織間質にはkiller/suppressorのT細胞が優位に増加しており、癌の進展度、リンパ節転移の有無さらに化学療法への感受性との間に有意の相関があると報告している。

その中でKikuchi *et al.*³⁵⁾はラットメチルコラントレン肉腫自家移植で腫瘍内浸潤リンパ球の程度は癌細胞の抗原性に比例することを示し、さらにIshii *et al.*³⁶⁾は高抗原のもの程リンパ球浸潤が多く、しかもLy1⁺Ly2⁻のT細胞が特徴的に増加しており予後とも関連することを示し、こうしたリンパ球の反応が担癌動物の積極的な免疫応答であり、腫瘍関連抗原を認識している可能性を初めて示した。

4・1・3 腫瘍内浸潤リンパ球の機能

さて腫瘍内に浸潤しているリンパ球は、腫瘍に対して特異的に集積した実際にeffector細胞として機能しているのだろうか。今回我々は腫瘍内に浸潤しているリンパ球を分離し、その機能を*in vitro*、*in vivo*両面から検索しその問題に対する重要な結果を得た。つまり第1に腫瘍を拒絶するようになったラットの腫瘍内浸潤リンパ球の数は、非免疫のそれと比較して約25~125倍と増加していたこと。第2にそのリンパ球はkiller/suppressorの形態をもつT細胞が特徴的に増加しており、しかもeffector細胞としてT-9細胞に対するキラー活性を示したこと。第3にそのキラー活性はNK活性を有さず、T-9細胞に特異的であったこと。第4に*in vivo*でもWinn試験において著明な腫瘍増殖抑制効果を示したことである。以上のことは腫瘍内浸潤

リンパ球が腫瘍関連抗原を認識していることを強く示唆するものであった。

ところで腫瘍組織に対する破壊機序としての免疫反応はNK細胞、LAK細胞、CTL、活性化MΦ等に代表されるが、現在までの報告は患者あるいは担癌動物の脾細胞やPBLに関するものが多く、腫瘍内に浸潤しているリンパ球について検索したものは少ない。Vose *et al.*³⁷⁾はnasopharyngeal cancerにおいてTILを分離しその機能を検索しているが、PHA、MLC等の反応性は認められるがNK活性は14例中1例にしかも極く低値をとると報告している。さらに肺癌、乳癌においてTILはむしろsuppressorとして機能しているのではないかと報告している³⁸⁾。しかし我々の腫瘍を拒絶するようになったラットのTILは著明なキラー活性を示し、かつT-9細胞に特異的であった。

このTILのキラー活性の違いの理由としては以下のことが考えられる。第1にTILの担癌動物あるいは患者からの分離の時期の問題である。Hiratsuka *et al.*^{14,15)}は臨床病期が進むに従ってリンパ球の反応が低下してくると指摘しているし、Taniyama and Holden³⁹⁾も腫瘍内浸潤MΦの活性は腫瘍が増大している時期には低値をとると報告している。第2に腫瘍の抗原性の問題である。Prehn and Lappé⁴⁰⁾の免疫刺激説によれば、少量の腫瘍細胞あるいは少量の抗原刺激はむしろsuppressor T細胞を活性化させ腫瘍の増殖を起こしてしまう。一方高抗原の腫瘍ではそれに対するリンパ球反応も著しくしかもkiller/suppressorのT細胞が優位に増加してくるのである^{35,36)}。第3にはTIL分離時の腫瘍細胞の混入である。このことはまずcold target inhibitionによりキラー活性を低下させてしまうことと、腫瘍細胞からの可溶性因子の放出といった両面を意味している。Hersey *et al.*⁴¹⁾はメラノーマ細胞からIL-2産生を阻害する因子が出ると報告しているが、CTLの増殖因子であるIL-2の阻害はこうしたキラー活性の実験系では重大な関連をもつ。我々は以上のことを避けるために、腫瘍の拒絶の盛期にTILを腫瘍組織より分離し、また常に腫瘍細胞の混入をチェックして使用している。

それではこのキラー活性はどのリンパ球によって発現されるものであろうか。複雑な生体の免疫ネットワークの中で、腫瘍の認識、A細胞からヘルパーT細胞への提示、また一方でCTLの誘導、分化といった相互に深く関連した様々な細胞とリンホカイン等の因子による免疫反応の流れは、到底ある一面だけでは捉えきれない問題である。Greenberg *et al.*⁴²⁾はCBF₁マウスに

Friend virus-induced leukemia で免疫した脾細胞を様々な T 細胞の分画に分けて adoptive transfer し、またサイクロホスファミドを併用して治療実験を行っているが、腫瘍の拒絶には *in vitro* で cytotoxicity を示す $Ly2^+$ の T 細胞ではなく、 $Ly2^-$ の T 細胞が重要な役割を果たしている。その機序として以下の 3 つを挙げている。1) $Ly2^-$ T 細胞の抗体産生に関連した抗腫瘍効果。2) $Ly2^-$ T 細胞による DTH 反応。3) CTL の誘導による抗腫瘍効果。1), 2) については抗体の担癌動物への移入は効果がないこと、確かに腫瘍局所で炎症細胞を主とする DTH 反応はおきているが、CTL や primed された腫瘍に特異的な CTL precursor も存在しており、また $Ly2^-$ T 細胞を B マウスに接種すると DTH 反応はおきるはずだが効果がないことにより否定的である。一方 3) の CTL の誘導については、こうした CTL が *in vitro* でキラー活性を有しており、また Winn 試験でも抗腫瘍効果を示すことより最も考えやすいこととし、さらに $Ly2^-$ T 細胞からこうした CTL が誘導されるには時間がかかるとの予測は、実際の腫瘍拒絶の際には $Ly2^-$ T 細胞接種後 1~2 週間後から始まることと一致するとして CTL の誘導が重要としている。

それでは何故担癌動物への $Ly2^+$ の T 細胞による治療の効果がないことについては、 $Ly2^+$ の T 細胞の寿命は $Ly2^-$ の T 細胞に比べて短命であり長期にわたる腫瘍抑制効果を示し得ないとしている。同じく Fujiwara *et al.*⁴³⁻⁴⁵⁾ は B マウスに syngeneic X 5563 plasmacytoma で免疫した C3H/HeN マウスの脾細胞を様々な T 細胞の分画に分けて transfer し腫瘍の拒絶をみているが、 $Lyt1^+2^-$ の T 細胞が重要な役割を果たしていると報告している。それは腫瘍局所にもリンパ節あるいは脾臓においても CTL 活性はみられなかったことより、CTL の誘導や抗体とは関係なく、 $Lyt1^+2^-$ の T 細胞が作るリンホカインによる MΦ や NK 細胞、LAK 細胞を effector 細胞とする DTH 反応としている。

一方 $Lyt1^+2^-$ の CTL による抗腫瘍効果が重要とする報告も多い^{46,47)}。我々の結果でも明らかに増加している $Lyt1^+Ly2^-$ の T 細胞が腫瘍拒絶に重要な役割を果たしていることは TIL から $Ly2$ 陽性細胞を除去すると著明にキラー活性が低下することからも伺われる。

このような相異の原因は何であろうか、Leclerc and Canter⁴⁸⁾ はマウスに M. MSV (murine sarcoma virus strain Moloney) を接種すると二種類の異なった反応が起きてくると報告している。Type I は $Lyt1$ 陽性細胞による DTH 反応で MSV 誘導 sarcoma を縮小させる。

Type II は $Ly2.3$ 陽性細胞による CTL 活性で MLV (Moloney leukemia virus) lymphoma に特異的に反応する。こうした二面性は先に述べた一連の免疫応答の流れのどこにポイントをおくかだけでなく、様々な腫瘍系、担癌動物の状態、抗原性の違い等によって複雑に修飾されて多彩な免疫応答が起きることを示している。

4・1・4 免疫動物の脾細胞、PBL の機能

さて非常に興味深いことは、TIL が T-9 細胞に対して著明なキラー活性を示したのに対し同じ免疫動物の脾細胞、PBL には認められなかったことである。脾臓は外来からの抗原集積の main site⁴⁹⁾ であり、リンパ球も豊富なことより様々な免疫反応が起きている。ここで CTL の分化を考えてみると、まず抗原提示細胞から抗原と Ia 分子の呈示がなされ、ヘルパー前駆細胞は primed となり MΦ の産生する IL-1 に感受性を持つようになる。次いで IL-1 の刺激によりヘルパー T 細胞は IL-2 を産生するようになる。一方 CTL 前駆細胞は抗原を class I MHC 分子とともに認識し primed CTL 前駆細胞となり IL-2 に感受性をもつようになる。IL-2 によってクローナルに増殖する過程で Wagner *et al.*⁵⁰⁾ の言う cytotoxic T cell differentiation factor (CTDF) の作用を受け CTL へと分化、成熟していく。この過程で IL-2 の存在は非常に重要だが、免疫反応の盛んなリンパ組織の IL-2 濃度は、他の組織よりも高いことが示唆される。一方 Ting *et al.*⁵¹⁾ によれば *in vitro* で高濃度 (5~15u/ml) の IL-2 は非特異的な suppressor T 細胞を増加させ、低濃度の IL-2 (0.5~1.5 u/ml) は CTL を誘導すると報告している。同じ現象が *in vivo* で起きるとすれば、それはもっと微量な濃度によって起きるだろうし、そうすれば様々な抗原に対して免疫活動の盛んな脾臓では IL-2 濃度が腫瘍組織内よりも高く、T 細胞はむしろ suppressive な状態にあると考えられる。脾臓の T 細胞にキラー活性のない理由として前述の他に Holden *et al.*⁵²⁾ の述べているように脾臓には大型の細胞が増加しているが、腫瘍内浸潤リンパ球は小型であり、おそらく腫瘍組織へ migration する過程で CTDF 等の修飾を受け、キラー活性を持つ成熟した T 細胞になるのかもしれない。その傍証として我々は Lewis ラット Con A blast 脾細胞と HPRT deficit AKR thymoma cell (BW 5147) をポリエチレングリコール存在下に細胞融合させ、CTDF を産生するクローンを得ているが⁵³⁾、この factor によって免疫を獲得した Fisher ラットの脾細胞から T-9 細胞に対してキラー活性を持つ CTL を誘導できた。

もう一つ興味深いことは、免疫動物に T-9 細胞を接種し、4 日目の PBL に一過性の T-9 細胞に対するキラー活性が認められたことである。その時期はまさに腫瘍拒絶の始まる直前であり、もともと少ないながら存在したキラー T 細胞が選択的に末梢血液中に放出され腫瘍組織へと動員される過程なのか、あるいは逆に腫瘍局所での免疫反応で過剰に生産されたキラー T 細胞が末梢血液中に放出されたのかそのいずれかと思われる。

4.1.5 腫瘍内に浸潤する各種細胞の役割

さて腫瘍破壊の effector 細胞として TIL はどのような場所に位置づけられるのであろうか。Burnet の発癌に対する免疫監視機構⁵⁴⁾の理論においてその主役は T 細胞であった。しかし T 細胞が欠如しているヌードマウスが樹立・研究されるにつれて、ヌードマウスの自然発生癌化率や化学発癌剤による発癌の頻度はむしろ低いことが報告され⁵⁵⁾、監視機構における T 細胞の役割について疑問が生じてきた。この背景のもとに生体内に自然に用意されている、それだけで抗腫瘍作用をもつ NK 細胞が見い出され、ヌードマウスには NK 活性が高いことが示された⁵⁶⁾。

一方担癌患者のみならず正常人 PBL を IL-2 の存在下に培養すると自己の腫瘍細胞に対して短時間で抗腫瘍効果をもつキラー細胞が見い出された⁵⁷⁾。この lymphokine-activated killer cell (LAK) は腫瘍特異性はないが NK 抵抗性腫瘍にも抗腫瘍効果を示す点、また分化への時間が 2~3 日かかる点で NK 細胞と区別される。

CTL を含めてこれらの細胞群は決して無秩序に生体内に存在するのではなく、進化のプログラムに沿って形成された免疫ネットワークの構成員として相互に関連していると考えられる。まず NK 細胞は自然に生体内に存在し、原始的な自然免疫機構に主要な役割を演ずる細胞であって、その反応には拘束性や特異性がない。ついで特定の非特異的刺激で誘導され、IL-2 によって活性化される LAK 細胞があるが、これも拘束性や特異性には乏しい。キラー細胞の分化の頂点に存在するのが MHC 拘束性と抗原に対する特異性をもつ CTL であろう。しかし Kedar *et al.*⁵⁸⁾ は様々なリンパ球を IL-2 で維持していくうちに CTL の中でも NK 細胞や LAK 細胞の特徴をもつものが出現すると報告しており、決して CTL は限られた狭い分化の中に存在するのではなく広い進化のスペクトラムの中に存在するものであると思われる。

一方 MΦ の機能は非常に複雑である。担癌動物の抑

制細胞として抑制 T 細胞、抑制 B 細胞、抑制 MΦ があるが、井口・石井⁵⁹⁾ はメチルコラントレン誘発担癌動物には二種類の抑制細胞、T 細胞と MΦ がみられると報告している。このうち MΦ は MLTC, PHA, MLC 等を非特異的に抑制すると指摘している。

しかし一方で MΦ は T 細胞からのリンホカインや細菌菌体成分により活性化し非特異的に腫瘍細胞を破壊することも知られている。腫瘍内浸潤 MΦ に限れば、Taniyama and Holden⁵⁹⁾ は時期によって MΦ のキラー活性は変動し、腫瘍を拒絶している時期の MΦ にはキラー活性がみられるが、腫瘍が増大している時期では認められないと報告している。T 細胞に suppressor T 細胞と helper T 細胞があるように MΦ も免疫系全体のホメオスタシスの上で正・負両方に作用する細胞群から成り立つのかもしれない。また MΦ は IL-1 を出したり MCDF⁶⁰⁾ を出したりしてさらに複雑に T 細胞特に CTL の発現に関係している。

4.2 TIL の長期培養について

最近 Interleukin-2 (IL-2) の存在下で CTL を長期間維持し、また種々の機能を持つ T 細胞をクローンレベルで解析できるようになった^{33,34)}。我々も TIL を 3 カ月間 T-9 細胞に対するキラー活性を失わずに長期培養することができた。また Winn 試験でも著明な腫瘍増殖抑制効果を示した。

ところで TIL を IL-2 存在下で培養すると LAK 細胞が出現するという報告がある⁶¹⁾。この LAK 細胞は末梢血由来の LAK 細胞と異なり、正常細胞には障害を示さず、また腫瘍細胞に対してより強いキラー活性を示す。我々の系では LAK 細胞の出現は認められなかった。このことは TIL が少なくとも T-9 細胞に対して CTL と分化していく過程の細胞集団であり、また抗原刺激を繰り返すことにより特異性が保たれたものと思われる。Andrew *et al.*⁶²⁾ はインフルエンザウイルスに特異的な CTL を用い、CTL の維持には抗原刺激が必要でそれは IL-2 receptor の増加を引き起こすと報告している。

今後はこうした CTL の IL-2 を用いた増殖・維持を利用して人癌の免疫療法の道が開かれたわけであるが、*in vitro* での IL-2 を用いた培養は homing の変化を引き起こすことも知られており⁶³⁾ まだ問題は多い。

以上のことにより、ラット gliosarcoma (T-9) 細胞を完全に拒絶するようになった Fisher ラットの腫瘍内には著しい Ly1⁺ Ly2⁺ の T 細胞の浸潤がみられ、この T 細胞が *in vitro*, *in vivo* において T-9 細胞に対する特異的なキラー活性を示し、腫瘍関連抗原を認識している可能性が強く示唆された。また IL-2 を用いて CTL

の培養を行ない、治療実験へ応用し得ることを示した。

5 結 論

Fisher ラット由来 gliosarcoma (T-9) 細胞を用いて腫瘍拒絶を担うリンパ球の機能的解析を行なった。

1) T-9 細胞を拒絶するようになった Fisher ラットの拒絶時の腫瘍組織中には著しいリンパ球浸潤がみられ、免疫組織学的にその大部分は Ly1⁺ Ly2⁺ の T 細胞であった。

2) この T 細胞を腫瘍組織から分離しそのキラー活性を検索すると、T-9 細胞に特異的な著明なキラー活性が認められた。Winn 試験でも著明な腫瘍増殖抑制効果を示した。

3) 脾細胞には T-9 細胞に対するキラー活性がないこと、しかし免疫動物の腫瘍内にはリンパ球が非常に多くしかも腫瘍特異性が高かったことは、これら腫瘍内浸潤リンパ球が腫瘍関連抗原を認識している可能性が強いことを示している。

4) TIL から Ly2 陽性細胞を除去するとキラー活性が著明に減少することより、腫瘍拒絶の effector 細胞は Ly1⁺ Ly2⁺ の T 細胞であることを示した。

5) IL-2 の存在下でこうした CTL の長期にわたる維持・増殖が可能となり、治療実験へ応用し得ることを示した。

文 献

1. Handley, W. S.: The pathology of melanotic growths in relation to their operative treatment. *Lancet* 1, 927-933 (1907).
2. Black, M. M., Opler, S. R. and Speer, F. D.: Microscopic structure of gastric carcinomas and their regional lymph nodes in relation to survival. *Surg. Gynec. Obstet.* 98, 725-734 (1954).
3. Black, M. M., Opler, S. R. and Speer, F. D.: Survival in breast cancer cases in relation to the structure of the primary tumor and regional lymph nodes. *Surg. Gynec. Obstet.* 100, 543-551 (1955).
4. Moore, O. S. Jr. and Foote, F. W. Jr.: The relatively favorable prognosis of medullary carcinoma of the breast. *Cancer* 2, 635-642 (1949).
5. Bennett, S. H., Futrell, J. W., Roth, J. A., Hoyer, R. C. and Ketcham, A. S.: Prognostic significance of histologic host response in cancer of the larynx or hypopharynx. *Cancer* 28, 1255-1265 (1971).
6. Martin, R. F. and Beckwith, J. B.: Lymphoid infiltration in neuroblastomas.: Their occurrence and prognostic significance. *J. Pediatr. Surg.* 3, 161-164 (1968).
7. Lunder, I. and Aherne, W.: The significance of lymphocytic infiltration in neuroblastoma. *Br. J. Cancer* 26, 321-330 (1972).
8. Bloom, H. J. G. and Field, J. R.: Impact of tumor grade and host resistance on survival of women with breast cancer. *Cancer* 28, 1580-1589 (1971).
9. 菊地浩吉: 癌組織におけるリンパ球浸潤の臨床的意義. *日臨外会誌* 40, 1-6 (1979).
10. Shimokawara, I., Imamura, M., Yamanaka, N., Ishii, Y. and Kikuchi, K.: Identification of lymphocyte subpopulation in human breast cancer tissue and its significance; An immunoperoxidase study with anti-human T- and B-cell sera. *Cancer* 49, 1456-1464 (1982).
11. Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497 (1975).
12. Williams, A. F., Galfré, G. and Milstein, C.: Analysis of cell surfaces by xenogeneic myeloma-hybrid antibodies: Differentiation antigens of rat lymphocytes. *Cell* 12, 663-673 (1977).
13. Mason, D. W., Brideau, R. J., McMaster, W. R., Webb, M., White, R. H. A. and Williams, A. F.: Monoclonal antibodies that define T-lymphocyte subset in the rat. In: Kennett, R. H., McRearn, T. J. and Bechtol, K. B.: *Monoclonal antibodies*. 251-273, Plenum Press, New York and London (1980).
14. Hiratsuka, H., Imamura, M., Kasai, K., Kamiya, H., Ishii, Y., Kohama, G. and Kikuchi, K.: Lymphocyte subpopulations and T-cell subsets in human oral cancer tissues: Immunohistologic analysis by monoclonal antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.* 81, 464-470 (1984).
15. Hiratsuka, H., Imamura, M., Ishii, Y., Kohama, G. and Kikuchi, K.: Immunohistologic detection of lymphocyte subpopulations infiltrating in human oral cancer with special reference to its clinical significance. *Cancer* 53, 2456-2466 (1984).
16. Benda, P., Someda, K., Messer, J. and Sweet, W. H.: Morphological and immunochemical studies of rat glial tumor and clonal strains propagated in culture. *J. Neurosurg.* 34, 310-323 (1971).
17. Ogiu, T., Onodera, H., Sakura, Y. and Maekawa, A.: Histogenesis of PNU-induced rat thymic lymphoma. *Proc. Jpn. Cancer Assoc.* 41, 37 (1982).
18. Ishii, Y., Matsuura, A., Iwaki, H., Takami, T. and Kikuchi, K.: Two closely related antigens expressed on granulocytes, macrophages and some

- reticular elements in rat lymphoid tissues: Characterization by monoclonal antibodies. *Immunology* **51**, 477-487 (1984).
19. Matsuura, A., Ishii, Y., Yuasa, H., Narita, H., Kon, S., Takami, T. and Kikuchi, K.: Rat T lymphocyte antigens comparable with mouse Lyt-1 and Lyt-2, 3 antigenic systems: Characterization by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **132**, 316-322 (1984).
 20. Brideau, R. J., Carter, P. B., McMaster, W. R., Mason, D. W. and Williams, A. F.: Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* **10**, 609-620 (1980).
 21. White, R. A., Mason, D. W., Williams, A. F., Galfré, G. and Milstein, C.: T lymphocyte heterogeneity in the rat: Separation of functional subpopulations using a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* **148**, 664-673 (1978).
 22. Uede, T., Hirata, F., Hirashima, M. and Ishizaka, K.: Modulation of the biologic activities of IgE-binding factors. I. Identification of glycosylation-inhibiting factor as a fragment of lipomodulin. *J. Immunol.* **130**, 878-884 (1983).
 23. Uede, T., Ishii, Y., Matsuura, A. and Kikuchi, K.: Thy-1 antigen on rat bone marrow cells: Immunohistochemical and fine morphological studies. *Tohoku J. Exp. Med.* **136**, 391-404 (1982).
 24. Hsu, S. M., Raine, L. and Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 577-580 (1981).
 25. Uede, T., Ishii, Y., Matsuura, A., Shimokawara, I. and Kikuchi, K.: Immunohistochemical study of lymphocytes in rat pineal gland: Selective accumulation of T lymphocytes. *Anat. Rec.* **199**, 239-247 (1981).
 26. Uede, T. and Ishizaka, K.: Formation of IgE-binding factors by rat T lymphocytes. VI. Cellular mechanism for the formation of IgE-potentiating factor and IgE-suppressive factor by antigenic stimulation of antigen-primed spleen cells. *J. Immunol.* **129**, 1391-1397 (1982).
 27. Gillis, S. and Smith, K. A.: Long-term culture of tumor-specific cytotoxic T cells. *Nature* **268**, 154-156 (1977).
 28. Morgan, D. A., Ruscetti, F. W. and Gallo, R. C.: Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* **193**, 1007-1008 (1976).
 29. Farrar, J. J., Simon, P. L., Koopman, W. J. and Fuller-Bonar, J.: Biochemical relationship of thymocyte mitogenic factor and factors enhancing humoral and cell-mediated immune responses. *J. Immunol.* **121**, 1353-1360 (1978).
 30. Farrar, J. J., Benjamin, W. R., Hilfiker, M. L., Howard, M., Farrar, W. L. and Farrar, J. F.: The biochemistry, biology, and role of Interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. *Immunol. Rev.* **63**, 129-166 (1982).
 31. Huff, T. F., Uede, T. and Ishizaka, K.: Formation of rat IgE-binding factor by rat-mouse T cell hybridomas. *J. Immunol.* **129**, 509-514 (1982).
 32. Farrar, J. J., Mizel, S. B., Farrar, J. F., Farrar, W. L. and Hilfiker, M. L.: Macrophage-independent activation of helper T cells. I. Production of Interleukin 2. *J. Immunol.* **125**, 793-798 (1980).
 33. Gillis, S., Ferm, M. M., Ou, W. and Smith, K. A.: T cell growth factor: Parameter of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.* **120**, 2027-2032 (1978).
 34. Stadler, B. M. and Oppenheim, J. J.: Human Interleukin-2: Biological studies using purified IL-2 and monoclonal anti-IL-2 antibodies, In: Mizel, M. B.: *Lymphokines* **6**, 117-121, Academic Press, New York (1982).
 35. Kikuchi, K., Ishii, Y., Ueno, H. and Koshiba, H.: Cell-mediated immunity involved in autochthonous tumor rejection in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **276**, 188-206 (1976).
 36. Ishii, Y., Matsuura, A., Takami, T., Uede, T., Ibayashi, Y., Uede, T., Imamura, M., Kikuchi, K. and Kikuchi, Y.: Lymphoid cell subpopulations infiltrating into autologous rat tumors undergoing rejection. *Cancer Res.* **44**, 4053-4058 (1984).
 37. Vose, B. M., Vánky, F., Argov, S. and Klein, E.: Natural cytotoxicity in man: Activity of lymph node and tumor-infiltrating lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **7**, 753-757 (1977).
 38. Vose, B. M. and Moore, M.: Suppressor cell activity of lymphocytes infiltrating human lung and breast tumors. *Int. J. Cancer* **24**, 579-585 (1979).
 39. Taniyama, T. and Holden, H. T.: Cytotoxic activity of macrophages isolated from primary murine sarcoma virus (MSV)-induced tumors. *Int. J. Cancer* **24**, 151-160 (1979).
 40. Prehn, R. T. and Lappé, M. A.: An immunostimulation theory of tumor development.

- Transpl. Rev. 7, 26-54 (1971).
41. Hersey, P., Bindou, C., Czerniecki, M., Spurling, A., Wass, J. and MaCarthy, W. H.: Inhibition of interleukin 2 production by factors released from tumor cells. *J. Immunol.* **131**, 2837-2842 (1983).
 42. Greenberg, P. D., Cheever, M. A. and Fefer, A.: Eradication of disseminated murine leukemia by chemoimmunotherapy with cyclophosphamide and adoptively transferred immune syngeneic Lyt-1⁺2⁻ lymphocytes. *J. Exp. Med.* **154**, 952-963 (1981).
 43. Fujiwara, H., Aoki, H., Yoshioka, T., Tomita, S., Ikegami, R. and Hamaoka, T.: Establishment of a tumor-specific immunotherapy model utilizing TNP-reactive helper T cell activity and its application to the autochthonous tumor system. *J. Immunol.* **133**, 509-514 (1984).
 44. Fujiwara, H., Fukuzawa, M., Yoshioka, T., Nakajima, H. and Hamaoka, T.: The role of tumor-specific Lyt-1⁺2⁻ T cells in eradicating tumor cells *in vivo*. I. Lyt-1⁺2⁻ T cells do not necessarily require recruitment of host's cytotoxic T cell precursors for implementation of *in vivo* immunity. *J. Immunol.* **133**, 1671-1676 (1984).
 45. Fujiwara, H., Moriyama, Y., Suda, T., Tsuchida, T., Shearer, G. and Hamaoka, T.: Enhanced TNP-reactive helper T cell activity and its utilization in the induction of amplified tumor immunity that results in tumor regression. *J. Immunol.* **132**, 1571-1577 (1984).
 46. Leclerc, J. C., Gomard, E., Plata, F. and Levy, J. P.: Cell-mediated reaction against tumors induced by oncornavirus. II. Nature of the effector cells in tumor cell cytolysis. *Int. J. Cancer* **11**, 426-432 (1973).
 47. Rosenstein, M., Eberlein, T. J. and Rosenberg, S. A.: Adoptive immunotherapy of established syngeneic solid tumor: Role of T lymphoid subpopulations. *J. Immunol.* **132**, 2117-2122 (1984).
 48. Leclerc, J. C. and Canter, H.: T cell-mediated immunity to oncornavirus-induced tumors. II. Ability of different T cell set to prevent tumor growth *in vivo*. *J. Immunol.* **124**, 851-854 (1980).
 49. Atkins, R. C. and Ford, W. L.: Early cellular events in a systemic graft-vs-host reaction. I. The migration of responding and nonresponding donor lymphocytes. *J. Exp. Med.* **141**, 664-680 (1975).
 50. Wagner, H., Hardt, C., Rouse, B. T., Röllinghoff, M., Scheurich, P. and Pfizenmaier, K.: Dissection of the proliferative and differentiative signals controlling murine cytotoxic T lymphocyte response. *J. Exp. Med.* **155**, 1876-1881 (1982).
 51. Ting, C. C., Yang, S. S. and Hargrove, M. E.: Induction of suppressor T cells by interleukin 2. *J. Immunol.* **133**, 261-266 (1984).
 52. Holden, H. J., Haskill, J. S., Kirchner, H. and Herberman, R. B.: Two functionally distinct anti-tumor effector cells isolated from primary murine sarcoma virus-induced tumors. *J. Immunol.* **117**, 440-446 (1976).
 53. Uede, T., Ibayashi, Y. and Kikuchi, K.: Generation and analysis of rat-mouse T cell hybridomas that constitutively produce cytotoxic T cell differentiation factor. *Proc. Jpn. Cancer Assoc.* **43**, 100 (1984).
 54. Burnet, F. M.: The concept of immunological surveillance. *Progr. Exp. Tumor Res.* **13**, 1-27 (1970).
 55. Rygaard, J. and Povlson, C. O.: The nude mouse: The hypothesis of immunological surveillance. *Transplant. Rev.* **28**, 43-61 (1975).
 56. Kiessling, R., Klein, E. and Wigzell, H.: Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells; Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* **5**, 112-117 (1975).
 57. Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z. and Rosenberg, S. A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by Interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* **155**, 1823-1841 (1982).
 58. Kedar, E., Ikejiri, L., Gorelik, E. and Herberman, R. B.: Natural cellmediated cytotoxicity in *in vitro* and inhibition of tumor growth *in vivo* by murine lymphoid cells cultured with T cell growth factor (TCGF). *Cancer Immunol. Immunother.* **13**, 14-23 (1982).
 59. 井口 進・石井良文: 担癌ラットにおける免疫抑制の細胞性機構. *札幌医誌* **49**, 117-127 (1980).
 60. Finke, J. H., Scott, J., Gillis, S. and Hilfiker, M. L.: Generation of alloreactive cytotoxic T lymphocytes: Evidence for a differentiation factor distinct from IL 2. *J. Immunol.* **130**, 763-767 (1983).
 61. 西村孝司, 内山也寸志, 八木秀樹, 橋本嘉幸: 末梢リンパ球および腫瘍内浸潤リンパ球から誘導される Lymphokine activated killer (LAK) 細胞の性状. *日本免疫学会記録* **13**, 476-477 (1983).
 62. Andrew, M. E., Braciale, V. L. and Braciale, T. J.: Regulation of Interleukin 2 receptor expression on murine cytotoxic T lymphocyte clones. *J. Immunol.* **132**, 839-844 (1984).

63. Lotze, M. T., Line, B. R., Mathisen, D. J. and Rosenberg, S. A.: The *in vivo* distribution of autologous human and murine lymphoid cell growth in T cell growth factor (TCGF). Implication for adoptive immunotherapy of tumors. J.

Immunol. **125**, 1487-1493 (1980).

別刷請求先:

(〒 060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学脳神経外科学講座 伊林至洋