

キラーT細胞クローンによるヒトリグリオサルコーマ 関連抗原の解析

—インターフェロンの腫瘍関連抗原に及ぼす影響—

京都大学医学部脳神経外科学教室（指導：菊池晴彦教授）

宮 武 伸 一

〔原稿受付：昭和62年10月30日〕

Specific Cytotoxic Activity of T Lymphocyte Clones Derived from a Patient with Gliosarcoma Immunomodulatory Effect of Interferons on Tumor-Associated Antigen

SHIN-ICHI MIYATAKE

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. HARUHIKO KIKUCHI)

Eleven lymphocyte clones were established from the peripheral blood lymphocytes of a patient with gliosarcoma, by autologous tumor stimulation and limiting dilution technique using recombinant interleukin-2. Ten clones out of eleven were cytotoxic against an autologous tumor cell line GI-1. Seven clones of them were also cytotoxic against allogeneic brain tumor lines and HeLa cells, one was cytotoxic against several target cells, while two clones were specifically cytotoxic against GI-1 and allogeneic brain tumor cells. One of the eleven clones was not cytotoxic against any target cells tested, while lymphokine-activated killer cells induced by recombinant interleukin-2 alone exhibited cytotoxic activity against all target tumor cells tested. Surface phenotypic analysis revealed that all these lymphocyte clones expressed CD3 antigen and some of them expressed CD4 antigen and the others expressed CD8 antigen. Therefore, it was suggested that these clones were antigen-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones.

Four CTL clones were selected and used in the analysis of immunomodulatory effect of interferon (IFN)- β and IFN- γ . Preincubation of GI-1 cells with IFN- γ , but not with IFN- β augmented the susceptibility of GI-1 cells against the cytotoxic attack of CTL clones. While, preincubation of GI-1 cells with IFN- γ did not augment the susceptibility of target cells against

Key words: CTL clone, Gliosarcoma, Interferon, Interleukin-2, Tumor-associated antigen.

索引語：CTL クローン，グリオサルコーマ，インターフェロン，インターロイキン-2，腫瘍関連抗原。

Present address: Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

the cytotoxic attack of lymphokine-activated killer cells. Inhibition study of CTL activity by anti-HLA class-I monoclonal antibody revealed that the CTL activity of the two clones was blocked by this antibody, however, that of the other two clones was not blocked by this antibody. Immunofluorometrical study revealed that the surface expression of HLA class-I molecules on GI-1 cells was augmented not only by IFN- γ but also by IFN- β . There is the possibility that IFN- γ augmented the expression of tumor-associated antigen on the cell surface of GI-1 cells, which was recognized by CTL clones. The analysis with these antigen-specific CTL clones seemed to be useful in the elucidation of tumor-specific or tumor-associated antigens on autologous tumor cells.

はじめに

腫瘍細胞、ことにその細胞膜表面上に表現される腫瘍抗原を解析することは、細胞生物学的に腫瘍細胞の特性を解明するのみならず、悪性腫瘍に対する免疫療法の開発にもつながるものと考えられる。通常このような腫瘍抗原の解析にはモノクローナル抗体が用いられるが^{1,2)}、悪性腫瘍患者の免疫応答においては液性免疫因子より細胞性免疫因子の方が重要であると考えられている^{3,5,23,41)}。しかしながら、腫瘍抗原の解析には、lymphokine-activated killer (LAK)¹¹⁾、lectin-induced killer^{1,20,21,34)}、interferon induced killer^{9,39)}等の非特異的なキラー活性を示す細胞集団は不適当と考えられ、抗原特異的なキラーT細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL)、ことにそのクローン化細胞の樹立が必要である。現在まで、主として動物実験系において、腫瘍特異的なキラーT細胞が誘導されそれを用いた抗原解析、治療実験が報告されている^{14,18,26,32,42)}。ヒトの系においても、主としてメラノーマを対象としてクローン化CTLの誘導がなされ、その抗原および抗原認識機構の解析が行われている^{2,9,13,25)}。しかしながら、脳腫瘍を対象としてはこのような研究の報告はない。私達はグリオサルコーマ患者末梢リンパ球より抗原特異的なCTLを樹立し、それを用いた抗原解析を行った。あわせて、細胞膜表面抗原、ことに腫瘍関連抗原に対するインターフェロン (IFN) の影響をこれらCTLクローンをを用いて解析し若干の知見を得たので報告する。

研究材料および方法

1. グリオサルコーマ由来細胞株の樹立

グリオサルコーマ患者 (症例 Y.T., 61才, 男性) の手術摘出標本より細胞株 GI-1 を樹立した¹⁶⁾。GI-1 は

免疫組織学的には、glial fibrillary acidic protein 陰性、laminin, fibronectin 陽性であり、その染色体は多くの構造的、数的異常を示していた。GI-1の樹立およびその維持は10%非動化牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS, Grand Island Biological Co., Grand Island, NY) 添加 Dulbecco's modified MEM (日水製薬) (ストレプトマイシン 50 mg/ml およびペニシリン G 20万単位/l 添加) の培養液 (D'MEM 完全培地と呼ぶ) を用いた。

2. 標的細胞

GI-1のほか以下の腫瘍細胞ならびに株化細胞を標的細胞として、細胞障害性試験に用いた。すなわち、グリオサルコーマ株, SF-539 BT (University of San Francisco, Dr. J. T. Rutka より供与された), 悪性グリオーマ由来株 SK-MG-1, U-251 MG (名古屋大学吉田純先生より供与された), 子宮頸部癌由来の HeLa, 前立腺癌由来の 2PC-93, 胃癌由来の KATO-III, 正常肝臓上皮細胞由来の Chang's liver cell であり、これらは D'MEM 完全培地で継代維持した。このほか、Epstein-Barr Virus (EBV) 感染 Burkitt lymphoma 由来の Raji, T細胞白血病株 Molt-4, 成人T細胞白血病由来 KUT-2 および患者 Y.T. 末梢リンパ球をレクチンで刺激したリンパ芽球を用いた。これらリンパ球系腫瘍細胞株は10% FCS 添加 PRMI-1640 (日水製薬, 上記抗生物質添加) を用いて継代維持した。

3. リンパ球の調整

患者末梢血をヘパリン採血し、Ficoll-Papue (Pharmacia Fine Chemicals, AB Uppsala, Sweden) による比重遠沈分離法により末梢血単球を採取し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて3回洗浄後、以下の実験に使用した。また一部は10% dimethylsulfoxide 含有

PRMI 完全培地中で凍結し、液体窒素中に冷凍保存し、必要に応じて解凍した上実験に使用した。

4. 自家腫瘍刺激 (autologous tumor stimulation, ATS)

継代培養中の GI-1 を 0.1% トリプシンおよび 0.01% EDTA で処理し、single cell suspension を調整し、 10^5 /ml の濃度で D'MEM 完全培地中に浮遊させ、平底24穴プレートに 2×10^6 個ずつ培養し、24時間後に 9000 rad の放射線処理を施行し培養液を除去した。その後 RPMI 完全培地中に 10^6 個/ml の濃度で浮遊した患者リンパ球を 2×10^6 個ずつプレートに加え、ATS を行った。ATS 後 5 日間経過したリンパ球を responder とし、96穴マイクロプレートを用いて、それぞれ 1, 10, 100 個/well の細胞濃度で限界希釈法によるクローニングを施行した。この際、放射線処理を施行した患者自家リンパ球および GI-1 をそれぞれ、 10^5 個/well, 10^4 個/well 添加し、feeder layer cell とした。このクローニング時点より遺伝子組み換え型 T 細胞増殖因子 (recombinant interleukin-2, rIL-2) を 1×10^{-9} g 蛋白/ml の濃度で添加した。37°C, 5%CO₂ 下で約10日間培養し増殖してきたリンパ球を、新しい feeder layer cell を用意した24穴プレートに移し、細胞を増殖させ以下の実験に使用した。

5. LAK 細胞, ATS 非クローン化 CTL, アロ抗原反応性 CTL の調整

10^6 個/ml の濃度の患者リンパ球に上記濃度の rIL-2 のみを添加し、3-5 日間培養した細胞を LAK 細胞として用いた。また ATS 後 8 日目に rIL-2 を添加し、週に 1 度ずつ ATS を繰り返し継代培養した細胞を ATS 非クローン化 CTL とし実験に使用した。また同一患者リンパ球よりアロ抗原反応性 CTL を誘導した。すなわち、著者のリンパ球を Moss 等の方法により EBV に感染させ²⁴⁾、LCL-SM 細胞とした。患者リンパ球 2×10^6 個と放射線処理を施行した LCL-SM 細胞 2×10^6 個を24穴プレートを用いて混合培養を行い、週に一度ずつこのアロ抗原刺激を行うことにより、アロ抗原反応性 CTL を誘導した。

3. 細胞障害性試験

⁵¹Cr 遊離法により細胞障害性試験を行った⁹⁾。すなわち、標的細胞 10^7 個を 25 mM HEPES 緩衝 RPMI 完全培地 1 ml 中に浮遊させ、0.1 mCi のクロム酸ナトリウム (Amarsham, UK) を添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。PBS にて 3 回洗浄後、HEPES 緩衝 RPMI 完全培地中に 10^5 個/ml の濃度で浮遊さ

せ、96穴 U 底マイクロプレートに 0.1 ml ずつ用意した。この上に、さまざまな濃度のエフェクター細胞浮遊液 0.1 ml をそれぞれのエフェクター細胞/標的細胞 (E/T) 比に応じて添加し、37°C, 5%CO₂ 下に一定時間インキュベートした後、プレートを 1500 rpm, 10 分間遠沈し、その培養上清を 0.1 ml 回収し、ガンマカウンター (ANSR Gamma Counter, Abbott Laboratories, North Chicago, USA) にて放射活性を計測した。全てのアッセイはトリプリケートで行い、キラー活性は次式により算出した。

キラー活性 (%)

$$= (\text{計測値} - \text{自然解離}) \times 100 / (\text{最大解離} - \text{自然解離})$$

最大解離、自然解離はエフェクター細胞浮遊液の代わりに、1% Nonidet P-40 (半井薬品) および、HEPES 緩衝 RPMI 完全培地をそれぞれ 0.1 ml ずつ添加し、その培養上清を用いた。

7. コールドターゲット阻害試験

エフェクター細胞により認識される抗原が各種標的細胞に共通して存在するか否かを解析するため、コールドターゲット阻害試験を行った。すなわち、クロム非標識の腫瘍細胞をコールドターゲットとして、クロム標識した GI-1 10^4 個を混合し 0.1 ml の細胞浮遊液として、96穴プレートに用意し、この上よりエフェクター細胞浮遊液を添加し、キラー活性の測定を行った。

8. 抗 HLA class-I モノクローナル抗体によるキラー活性阻害試験

キラーT細胞による標的細胞攻撃機構における HLA class-I 分子の関与を解析するため、抗 HLA class-I モノクローナル抗体である W6/32 (DAKO-PATTS, Code 736, Denmark) を用いて、キラー活性阻害試験を行った^{24,30)}。すなわち、クロム標識した標的細胞を 2×10^5 個/ml の濃度で浮遊させ、96穴プレートに 0.05 ml ずつ用意した。ここに、HEPES 緩衝 RPMI 完全培地にて適当に希釈した W6/32 を 0.05 ml ずつ添加し、37°C で 45 分間インキュベーション後、エフェクター細胞浮遊液を 0.1 ml 添加し、キラー活性を測定した。

8. 標的細胞 GI-1 の IFNs 処理による CTL クローンのキラー活性の変化

GI-1 をヒト自然型 IFN- β および遺伝子組み換え型 IFN- γ で処理することにより、各エフェクター細胞のキラー活性がどのように変化するかを調べた。すなわち、対数増殖期の GI-1 細胞に対して、IFN- β および

IFN- γ をそれぞれ最終濃度 1000 units/ml の濃度で添加し, 24時間培養を続けた. これを標的細胞とし, 樹立した CTL クローンおよび LAK 細胞をエフェクター細胞としてそのキラー活性を測定した.

9. GI-1 の IFNs 処理による HLA class-I 分子の発現の変動

対数増殖期にある GI-1 細胞に対して, IFN- β , および IFN- γ をそれぞれ最終濃度 1000 units/ml となるように添加し, 24時間培養を続けた. その後, この GI-1 細胞上に表現される HLA class-I 分子を, W6/32 を 1次抗体に用いて, 間接蛍光抗体法により染色し, フローサイトメーター (FACS 440, Becton Dickinson, USA) によりその蛍光強度を計測することによって, その抗原の発現量を解析した. すなわち, GI-1 細胞浮遊液を 10^6 個/0.1 ml として PBS 中に調整し, W6/32 を最終50倍希釈となるように加え, 4°C , 30分間インキュベート後 PBS にて3度洗浄した. ここに2次抗体として FITC 標識ヤギ抗マウス抗体 (Ortho FITC-GAM) を加え, 4°C , 30分間インキュベート後 PBS にて3度洗浄し, フローサイトメーターにより解析した.

10. リンパ球表面抗原の検索

各種エフェクター細胞の表面抗原をモノクローナル抗体 OKT3, 4, 8 (Ortho Pharmaceutical Co., Raritan, NJ, USA) および Leu 7 (Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, California, USA) を 1次抗体として, 間接蛍光抗体法により染色し, フローサイトメーターを用いて検索した. すなわち, PBS 中に 10^6 個/0.1 ml として浮遊させたリンパ球に対して, 各種抗体を 0.01 ml づつ加え, 4°C , 30分間インキュベートし, PBS にて3回洗浄後, FITC 標識2次抗体と 4°C , 30分間反応させ, PBS にて洗浄後, フローサイトメーターにて解析した.

結 果

1. クローニング効率

放射線処理を施行した自家腫瘍細胞 GI-1 と PBL を feeder layer cell として用いると, feeder layer cell を用いない場合と比較してそのクローニング効率は高かった (Table 1). これは feeder layer cell が IL-2 以外の, T 細胞クローンの増殖に必要なリンホカインを産生しているか, もしくは feeder layer cell が何らかの signal を responder に伝達しその IL-2

Table 1. Cloning efficiency

Pre-stimulated responder lymphocytes were seeded at 1, 10 and 100 cells/well in 96-well microplates. Irradiated autologous PBL and GI-1 cells were prepared for feeder layer cells. The number in the parenthesis shows the percentage of cloning efficiency.

Rate	without feeder	with feeder ($\frac{1}{2}$ PBL + $\frac{1}{2}$ GI-1)
1 cell/well	0/192 (0%)	3/192 (1.6%)
10 cell/well	3/192 (1.6%)	10/192 (5.2%)
100 cell/well	5/96 (5.2%)	42/96 (43.8%)

受容体の発現を増強したことに起因すると考えられた. これらクローンのうち, feeder layer cell を用いて樹立したクローンから11個を選んで以下の実験に使用した. すなわち, TcGI-1, 3, 4, 7, 8, 9, 10 は 10個/well で限界希釈を行ったプレートより樹立したクローンであ

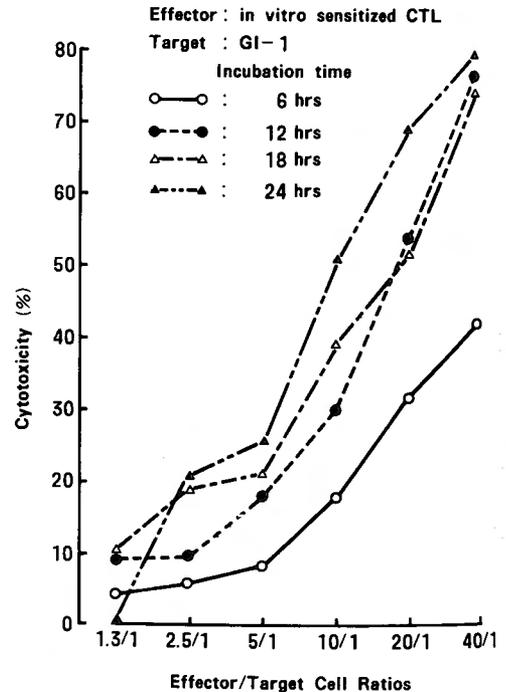


Fig 1. Incubation time of cytotoxicity assay with ^{51}Cr release. Secondly stimulated CTL were used as effector cells to determine the optimal incubation time for cell-mediated cytotoxicity against GI-1. Optimal percent specific lysis was obtained after more than 12 h incubation at each effector/target cell ratio.

り, TcGI-11, 12, 13 は 1個/well で限界希釈を行ったプレートより樹立したクローンである。

2. 細胞障害性試験 (クロム遊離法) の至適条件の検討

フラスコに付着して増殖する腫瘍細胞をクロム標識する際には, 酵素処理により single cell suspension を調整する必要があるが, この処理により細胞表面膜抗原は一時的に変化する可能性がある。このため通常の浮遊細胞を対象とする短時間のインキュベーションによるクロム遊離試験は不適当と考え, アッセイ時の至適インキュベーション時間を検討した。エフェクター細胞は 2回 ATS を施行した非クローン化 CTL を用いた。インキュベーション 6 時間では, 12 時間以降と比較して, 約半分のキラー活性しか検出されず, 12 時間以降ではキラー活性に差は認められなかった (Fig. 1)。これにより, キラー活性を正確に検出し, かつクロムの自然解離の少ない条件として, インキュベーション時間を 12 時間に固定して, 以下の実験を行った。

3. CTL クローンの標的細胞特異性

樹立した CTL クローン, LAK 細胞, ATS を 3 回施行した非クローン化 CTL の各種標的細胞に対す

るキラー活性は Fig. 2 に示した。すなわち, TcGI-1, 3, 4, 7, 8, LAK 細胞および非クローン化 CTL はすべて自家腫瘍細胞 GI-1 に対して, dose-dependent なキラー活性を示したが, TcGI-10 はキラー活性を示さなかった。LAK 細胞は調べ得たすべての標的細胞にキラー活性を示した。これに対して, TcGI-8 は GI-1 のみにしかキラー活性を示さず, その他のクローン, TcGI-1, 3, 4, 7 は GI-1 の他, HeLa 細胞に cross reactivity を示すものの, Chang's liver cell, Raji にはキラー活性を示さなかった。この傾向はさらに標的細胞の種類を増すことによって確認できた (Table 2)。これらの結果より, エフェクターリンパ球の細胞障害活性は 5 種類に分類できた。すなわち, ① TcGI-1 は GI-1 および他の株化脳腫瘍細胞, HeLa, KATO-III, 2PC-93 および Molt-4 にキラー活性を示した。② TcGI-3, 4, 7, 9, 11, 12, 13 は GI-1 の他, 株化脳腫瘍細胞および HeLa 細胞にキラー活性を示した。③ TcGI-6 は GI-1 および株化脳腫瘍細胞のみにキラー活性を示した。TcGI-8 は GI-1 以外の脳腫瘍細胞に対する反応性を検索できなかったが, その他の細胞にはキラー活性を示さなかった。④ TcGI-10 はどの標的細胞にもキラー活性を示さなかった。⑤ LAK 細胞

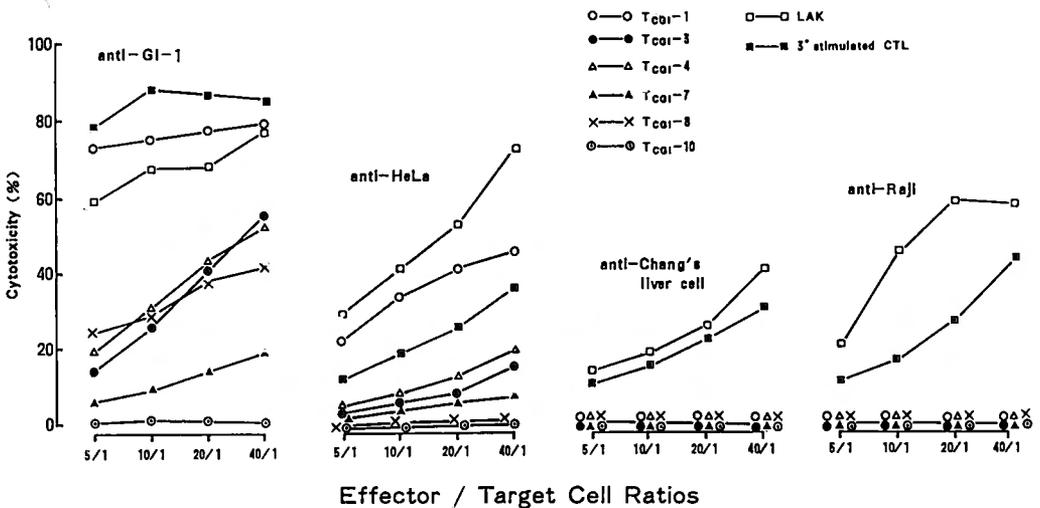


Fig. 2. Representative pattern of target specificity of effector lymphocytes. Each point represents percent specific lysis calculated from the mean of three replicate determinations. TcGI-1, 3, 4, 7 exhibited cytotoxicity against GI-1 and HeLa but they did not lyse Chang's liver cell and Raji. TcGI-8 killed only autologous tumor GI-1. TcGI-10 did not exhibit cytotoxic activity against any target cells, while LAK cells were cytotoxic against all target cells.

LAK: lymphokine-activated killer

3° stimulated CTL: tertiarily stimulated CTL

Table 2. Target specificity of CTL clonesValues are expressed as percent of specific ⁵¹Cr release at 40/1 effector/target cell ratio.

ND: not done

LAK: lymphokine-activated killer

PHA: phytohemagglutinin

	TcGI-1	TcGI-3	TcGI-4	TcGI-6	TcGI-7	TcGI-8	TcGI-9	TcGI-10	TcGI-11	TcGI-12	TcGI-13	LAK
GI-1	79.3	55.0	52.0	7.7	18.9	41.9	6.9	2.2	67.7	68.7	61.4	76.3
SF-539 BT	41.0	36.3	30.9	5.5	5.7	ND	ND	ND	26.7	11.0	ND	32.6
SK-MG-1	63.1	36.8	29.1	8.7	7.7	ND	ND	ND	37.1	28.3	ND	48.4
U-251 MG	18.3	7.9	5.5	0.7	3.3	ND	ND	ND	6.1	6.8	ND	58.3
Chang's liver cell	2.1	0.0	2.3	-1.5	2.2	0.3	2.3	-0.8	3.1	2.6	-1.0	41.5
HeLa	45.3	15.0	19.9	0.3	7.5	2.3	-0.4	-1.0	15.0	9.2	9.1	72.5
Kato-III	28.0	3.2	3.4	ND	2.6	0.4	ND	ND	1.0	2.1	ND	81.2
2PC-93	86.7	1.7	2.1	-1.0	5.0	-0.8	0.4	1.0	0.6	-1.0	-1.0	81.2
Raji	-5.0	-2.2	-1.9	2.0	-0.2	3.3	-0.6	-0.1	-1.5	0.1	-0.4	58.2
Molt-4	16.2	0.0	-1.0	ND	1.7	1.7	2.5	3.0	2.7	3.5	0.6	21.6
KUT-2	1.2	-0.4	-0.6	ND	-0.5	-2.3	ND	ND	ND	ND	ND	17.0
Auto. PHA blast	-1.1	-1.2	-0.1	0.2	0.1	-0.3	ND	ND	ND	ND	ND	-1.4

Each value represents Cytotoxicity (%) at E/T ratio of 40/1

は自家リンパ芽球以外のすべての標的細胞に対してキラー活性を示した。ATS 非クローン化 CTL も GI-1 に強いキラー活性を示したが、その他の標的細胞にもキラー活性を示した。

4. CTL クローンにより認識される共通抗原

標的細胞間に CTL クローンにより認識される共通抗原が存在するか否かを解析するため、cold target 阻害試験を行った。cold target に GI-1, HeLa, Chang's liver cell, 2PC-93, Raji をとると、TcGI-1 の GI-1 に対するキラー活性は、GI-1, HeLa, 2PC-93 により阻害されるが、Chang's liver cell, Raji には阻害を受けず、TcGI-1 により認識される抗原は GI-1, HeLa, 2PC-93 に共通に存在することがわかった (Fig. 3)。また TcGI-3 により認識される抗原は、GI-1, HeLa 発現し、TcGI-8 により認識される抗原は GI-1 のみしか存在しないことがわかった。一方 LAK 細胞はすべての cold target で阻害を受け、LAK 細胞は抗原特異的 CTL の集団ではないということがわかった。また各脳腫瘍細胞間には、調べた CTL クローン TcGI-3, 4, 11 により認識される共通抗原が存在す

ることがわかった (Fig. 4)。

5. CTL クローンによる標的細胞攻撃機構における HLA class-I 分子の関与

CTL クローンによる標的細胞攻撃機構における HLA class-I 分子の関与を調べるため、HLA class-I 分子に対するモノクローナル抗体、W6/32 を用いてキラー活性阻害試験を行った。アッセイに用いたアロ抗原反応性 CTL は LCL-SM 細胞にはキラー活性を示すが、Raji, Daudi 細胞には障害性を示さず、EBV-related 抗原を認識するものではなく、LCL-SM 細胞上に表現されるアロ抗原を認識すると考えられた (データ未提示)。まず必要な抗体量を決定するため、アロ抗原反応性 CTL を用いて阻害試験を行ったところ、少なくとも、W6/32, 8-16 µg/ml の最終濃度でキラー活性がブロックされた。この濃度の W6/32 を用いて、樹立した CTL クローンのキラー活性阻害試験を行ったところ、調べた4クローンのうち、TcGI-3, 7 のキラー活性は阻害を受けず、TcGI-11, 12 のキラー活性は抗体量依存性に阻害を受け、その標的細胞攻撃機構における HLA class-I 分子の必要性が示唆された

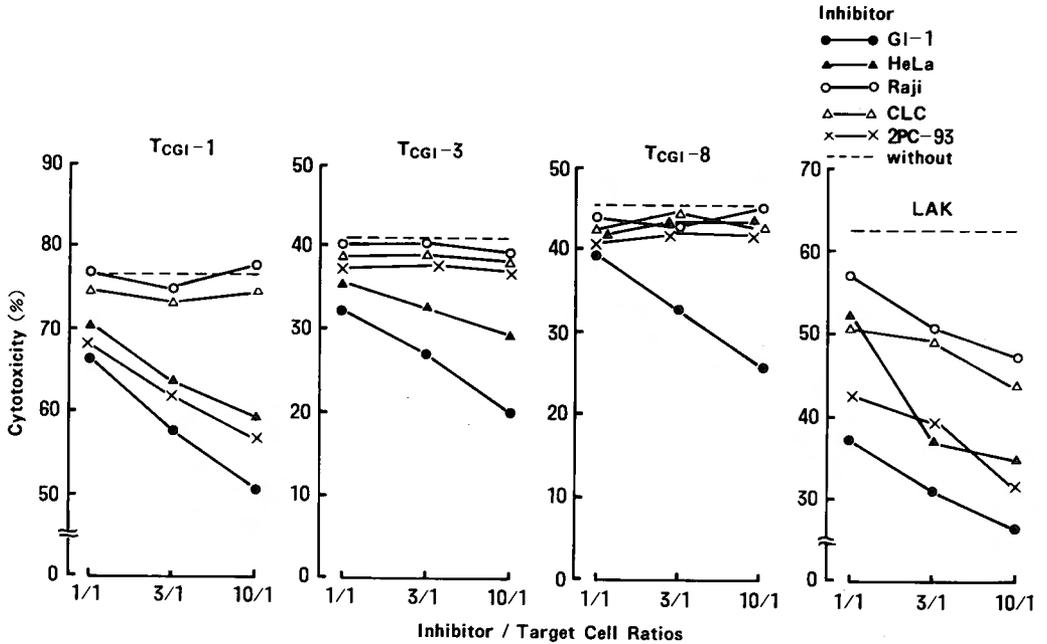


Fig. 3. Cold target inhibition experiment (1). Cytotoxic activity of TcGI-1, 3, 8 and LAK cells against GI-1 was assayed at an effector/target cell ratio of 20/1. The inhibitors (GI-1, HeLa, Raji, Chang's liver cell and 2PC-93) were added at inhibitor/target cell ratios of 1/1, 3/1 and 10/1. Dashed lines show cytotoxic activity in the absence of inhibitor cells. The cytotoxic activity of TcGI-1 against GI-1 was blocked by GI-1, HeLa and 2PC-93. That of TcGI-3 was blocked by GI-1 and HeLa cells. That of TcGI-8 was blocked by GI-1 alone. The cytotoxic activity of LAK cells was blocked by any inhibitor cells.

CLC: Chang's liver cell

LAK: lymphokine-activated killer

(Fig. 5).

6. GI-1 の IFNs 処理による CTL クローンのキラー活性への影響

IFN- γ (1000 units/ml) で GI-1 を前処理すると、各 CTL クローンの GI-1 に対するキラー活性は 2~3 倍増強された (Fig. 6)。しかしながら、IFN- β (1000 units/ml) で同様の処理を行っても、各 CTL クローンのキラー活性は変化がなかった。これに対して、LAK 細胞のキラー活性は GI-1 の IFN- γ 処理を行うと、むしろ低下した。この現象は GI-1 を IFN- γ で処理することは、単に GI-1 の細胞膜表面を脆弱化し細胞性免疫に対する抵抗性を減弱させるものではなく、同処理による CTL クローンのキラー活性の増強は、CTL クローンにより認識される。GI-1 上の何らかの膜表面抗原の発現が増強されたことに起因すると示唆された。またアッセイ中に IFNs を添加しても CTL クローンのキラー活性に変化はみられなかった

(データ未提示)。

7. IFNs 処理による GI-1 上の HLA class-I 分子の変動

IFN 未処理の GI-1 上にも HLA class-I 分子は存在するが、その発現量はわずかである (Fig. 7)。しかしながら、IFN- β および IFN- γ で GI-1 を処理すると、その細胞膜表面上の HLA class-I 分子の発現は共に増強され、その増強効果は 1000 units/ml の力価では両 IFN 間に差はなかった。また、HLA class-II 分子の発現も検索したが、GI-1 細胞表面上には HLA class-II 分子の発現は認めず、IFNs 処理によってもその発現はみられなかった (データ未提示)。

8. CTL クローンの細胞膜表面抗原

樹立した CTL クローンはすべて CD3 陽性であった。CTL クローンのうち、TcGI-3, 6, 9, 10, 12 は CD4 陽性、CD8 陰性であり、TcGI-4, 7, 8, 13 は CD4 陰性、CD8 陽性であった。また Leu7 陽性を示すクロ

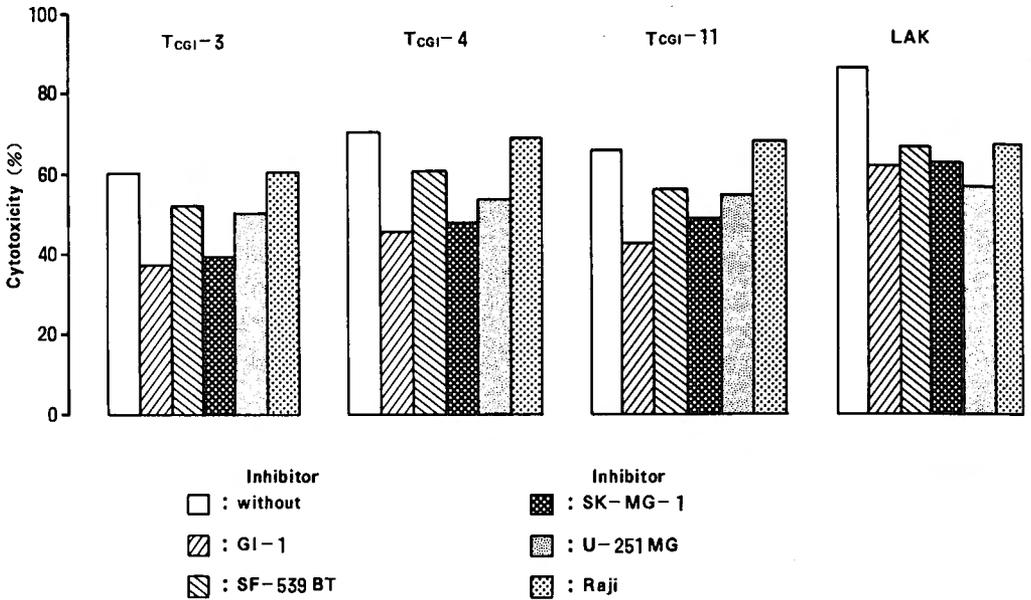


Fig. 4. Cold target inhibition experiment (II). The crossing (common) antigen between GI-1 and the other brain tumor lines were analyzed by cold target inhibition assay. Each assay was carried out with fixed effector/target and inhibitor/target cell ratio of 20/1 and 10/1 respectively. The cytotoxic activity of CTL clones against GI-1 was inhibited by GI-1 and the other brain tumor lines. However, that was not inhibited by B cell lymphoma, Raji cells. The cytotoxic activity of LAK cells was inhibited by any inhibitor cells.
LAK: lymphokine-activated killer

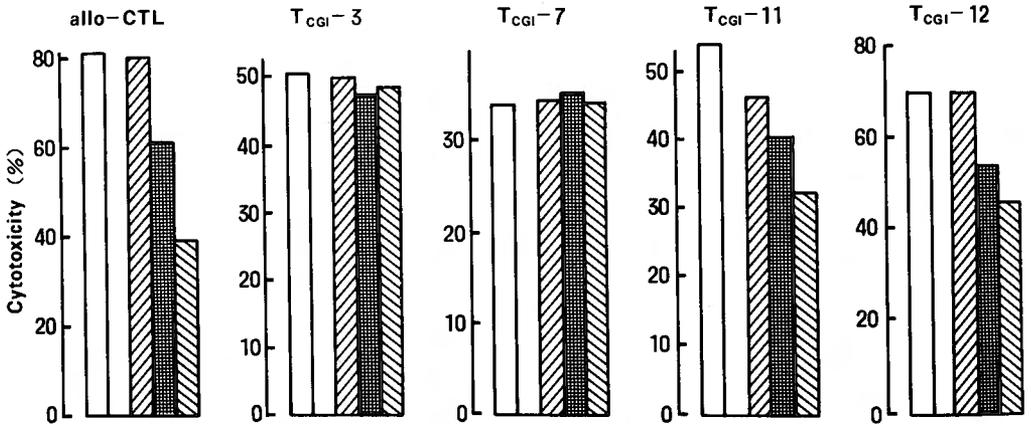


Fig. 5. Blocking cytotoxicity assay with anti-HLA class-I monoclonal antibody. Target cells were pretreated with anti-HLA class-I monoclonal antibody W6/32. Each bar represents specific percent lysis calculated from the mean of three replicate determinations. □: no treatment of GI-1 cells, ▨: W6/32 4 µg/ml, ■: W6/32 8 µg/ml, ▩: W6/32 16 µg/ml. To determine the saturating amounts of W6/32, alloreactive CTL were used in the control experiment. W6/32 blocked alloreactive cytotoxicity at the final concentration of 8-16 µg/ml. The cytotoxic activity of TcGI-11 and TcGI-12 was blocked with this antibody at this concentration, however, that of TcGI-3 and TcGI-7 was not blocked.

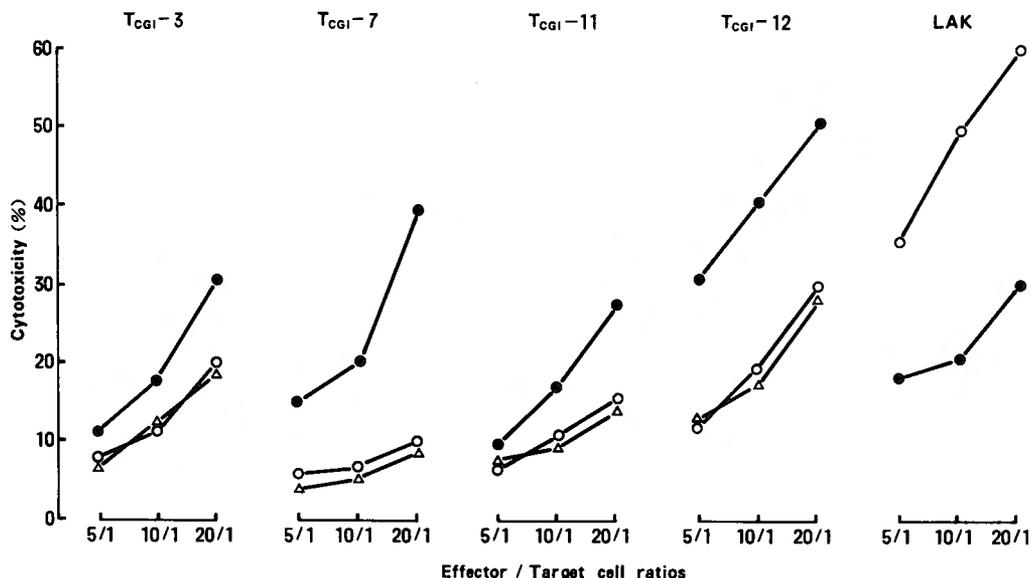


Fig. 6. Effect of IFNs on cytotoxic activity of CTL clones and LAK cells. Each point represents percent specific lysis calculated from the mean of triplicate determinations. The cytotoxic activity was assayed at the incubation time of 8 h. ○—○: no treatment of GI-1 cells, △—△: pretreatment of GI-1 cells with IFN- β 1000 units/ml, ●—●: pretreatment of GI-1 cells with IFN- γ 1000 units/ml. Pretreatment of GI-1 cells not with IFN- β but with IFN- γ augmented the susceptibility of GI-1 cells against cytotoxic attack of CTL clones. While, pretreatment of GI-1 cells with IFN- γ rather decreased the susceptibility of GI-1 cells against LAK cell attack.

ーンは認めなかった (Table 3). TcGI-1, 11 は共に, CD4, CD8 陽性細胞が混在し, single cell clone ではなく, oligo-clones であると示唆された。これに対し, LAK 細胞, 非クローン化 CTL 共に, CD4, CD8 陽性細胞が存在し, 細胞膜表面抗原における heterogeneity を示唆していた。

考 察

in vitro において自家腫瘍抗原刺激 (ATS) を繰り返し, rIL-2 を添加することにより, 脳腫瘍患者末梢リンパ球より, 自家腫瘍細胞 (GI-1) に対して強いキラー活性を有するキラーT細胞 (ATS 非クローン化 CTL) を誘導することができた。しかしながら, rIL-2 のみで誘導した LAK 細胞と比較して, この ATS 非クローン化 CTL は GI-1 以外の標的に対するキラー活性はやや低いものの (Fig. 2), 多くの細胞に対して cross reactivity を示していた。この非特異的なキラー活性は, ATS 非クローン化 CTL に抗原特異的なキラーT細胞集団以外にも, LAK 細胞等の anomalous な

キラー活性を示す細胞集団が含有されていることに起因すると考えられた。そこで, T細胞により認識される, 腫瘍特異抗原もしくは腫瘍関連抗原の解析には抗原特異的なT細胞クローンの樹立が不可欠であると考えられた。

この抗原特異的なT細胞クローンの樹立を目的として, ATS 後限界希釈を行い, 11個のT細胞クローンを樹立した。(細胞表面抗原の解析により, このうち2個は single clone ではなく, oligo-clones である可能性が強い。) これらT細胞クローンを用いて, 標的細胞特異性を検討し cold target 阻害試験を行った結果, 自家腫瘍細胞 GI-1 上に少なくとも3種類の腫瘍関連抗原の存在が明らかになった。すなわち, ①GI-1, 他の株化脳腫瘍細胞, HeLa, 2PC-93 等の細胞表面上に発現するが, Chang's liver cell, Raji 等には存在しない抗原 (TcGI-1 により認識される)。②GI-1, 他の株化脳腫瘍および HeLa に表現される抗原 (TcGI-3, 4, 7, 9, 11, 12, 13 により認識される)。③GI-1 のみ, もしくは GI-1 および他の脳腫瘍株のみに表現される抗原

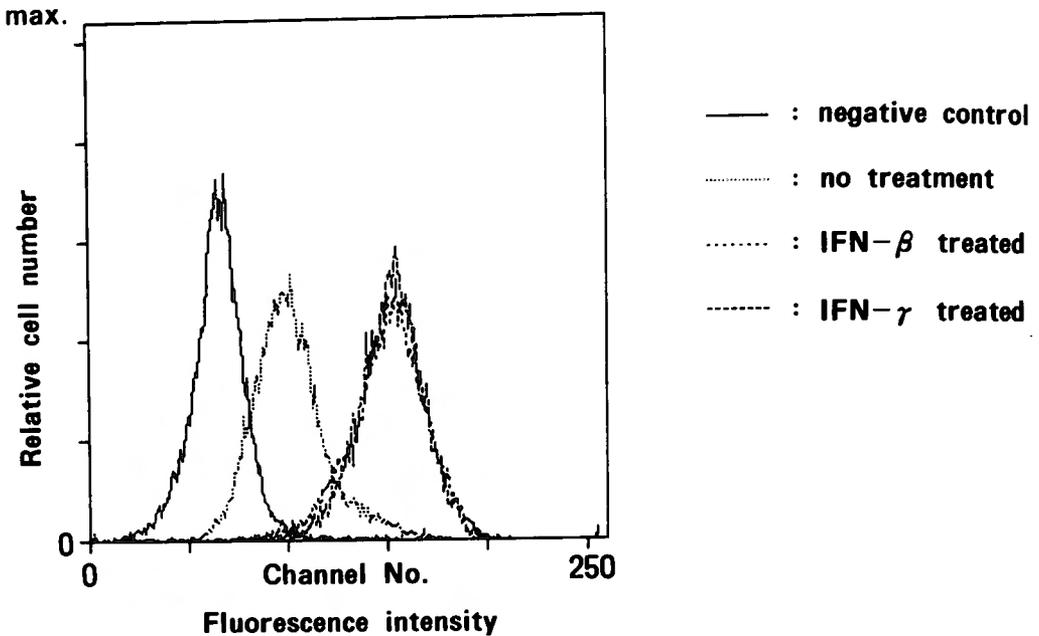


Fig. 7. Augmentation of HLA class-I molecules on GI-1 cells with IFNs. The surface expression of HLA class-I molecules on GI-1 cells was analyzed with monoclonal antibody of W6/32, by indirect immunofluorescence technique. GI-1 cells were treated with IFNs at the concentration of 1000 units/ml. Twenty four hours later, cells were stained with W6/32, as the first antibody. The negative control cells were treated with normal mouse serum as the first antibody instead of W6/32. The cells were analyzed by the flow cytometer, FACS 440. GI-1 cells without IFN treatment expressed HLA class-I molecules on the cell surface, however, its expression was not so much. While, both IFN- β and IFN- γ augmented the surface expression of HLA class-I molecules on GI-1 cells. Mean channels of fluorescence intensity of negative control, not treated, IFN- β and IFN- γ treated GI-1 cells were 65.5, 102, 149.5, and 151, respectively.

(TcGI-6,8 により認識される) である。勿論、②に属する抗原がすべて同じものであるという保証はない。例えば、TcGI-3 が認識する抗原と TcGI-4 が認識する抗原は共に同一細胞上に存在するが、その抗原決定基は異なっているのかもしれない。しかしながら、いずれにせよ GI-1 上には CTL クローンにより認識される少なくとも 3 種類の異なる抗原が存在することがわかった。またこれら CTL クローンはその標的細胞攻撃に際して抗原認識が必要であり、LAK 細胞の細胞攻撃機構とはまったく異なったものであると考えられた。

自家腫瘍細胞に対するキラー活性に関しては必ずしも LAK 細胞に比較して、抗原特異的キラー T 細胞クローンが強いとはかぎらず、ATS 非クローン化 CTL が最も強い活性を示した。この原因は、ATS 非クロー

ン化 CTL の主要細胞成分がキラー活性の高い CTL クローンにより構成されているのかもしれない、また、その構成細胞が相乗的に働いて強力な活性を発現しているのかもしれない。

ヒトリンパ球に対するモノクローナル抗体が作成されて以来、その表面抗原とリンパ球の機能について、多くの研究がなされてきた。初期の報告では細胞障害性(キラー) T 細胞の表面抗原は CD8 陽性、CD4 陰性のサブポピュレーションに限られるとされていたが^{27,28,29)}、アロ抗原反応性 CTL クローンの解析により、CD4 陽性および CD8 陽性の CTL が存在し、それぞれ HLA class-I および class-II 抗原を認識することが明らかにされた²²⁾。またメラノーマ反応性 CTL クローンおよび EBV-transformed B cell line 反応性 CTL クローンにおいても、CD8 陽性の CTL

Table 3. Surface phenotypes of CTL clones

TcGI-1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 were derived from the wells at the cloning ratio of 10 cells/well and TcGI-11, 12, 13 were derived from the wells at that of 1 cell/well. Surface antigen expression was analyzed by FCM. Fluorescence distribution was uniform and virtually 100% of cells of each clone was either positive or negative for a single antigen, except TcGI-1 and 11.

ND: not done

LAK: lymphokine-activated killer

3° ATS: tertiarily stimulated mass-cultured CTL

Clone	Antigen			
	T 3	T 4	T 8	Leu 7
TcGI-1	+	±	±	-
TcGI-3	+	+	-	-
TcGI-4	+	-	+	ND
TcGI-6	+	+	-	ND
TcGI-7	+	-	+	-
TcGI-8	+	-	+	-
TcGI-9	+	+	-	-
TcGI-10	+	+	-	-
TcGI-11	+	±	±	ND
TcGI-12	+	+	-	-
TcGI-13	+	-	+	ND
LAK	+	±	±	±
3° ATS	+	±	±	±

クローンのみならず、CD4 陽性の CTL クローンの報告がなされてきた^{8,33)}。われわれのクローンも5個は CD4 陽性であり、4個は CD8 陽性のクローンであった。しかしいずれのクローンも CD3 陽性、Leu7 陰性であり、antigen-specific T cell lineage のクローンであると考えられた。

これらの CTL クローンより4個のクローン、TcGI-3, 7, 11, 12 を用い、IFNs の immunomodulatory effect を検討した。標的細胞である GI-1 を IFN- γ で前処理すると、GI-1 に対するこれら CTL クローンのキラー活性は一様に増強された (Fig. 6)。しかしながら、同様の処理を行っても、LAK 細胞のキラー活性はむしろ低下した。この現象は、IFN- γ による前

処理が GI-1 上の、CTL クローンにより認識される細胞表面膜抗原の発現を増強したことを示唆していた。ここでは主として2つの可能性が考えられた。すなわち、①IFN- γ による前処理により、CTL クローンにより認識される腫瘍関連抗原の発現が増強された。②同処理により、HLA class-I 分子の発現が増強され、結果的に CTL クローンのキラー活性が増強された。しかしながら以下に述べる2つの根拠により、②の可能性は考えにくい。まず第一には、一般に抗原特異的細胞性免疫による標的細胞攻撃機構には2種類のタイプが知られている。すなわち、主要組織適合抗原拘束性の存在するタイプおよび存在しないタイプである^{2, 8, 10, 37, 43)}。実際に、われわれが調べた CTL クローンのうち TcGI-11, 12 はその標的細胞攻撃に際して、HLA class-I 分子の関与が必要であるが、TcGI-3, 7 は同分子の関与の必要性がみられなかった (Fig. 5)。ところが、IFN- γ 処理による CTL クローンのキラー活性の増強効果は TcGI-11, 12 のみならず TcGI-3, 7 でも認められた。第二に、一般に IFNs は主要組織適合抗原の発現を増強することが知られているが^{7, 12, 38)}、IFN- β 処理による GI-1 の HLA class-I 分子の発現増強効果は IFN- γ によるそれとかわりがないが、IFN- β 処理によっては CTL クローンのキラー活性に変化がみられないということである (Fig. 7)。以上の理由より、①の可能性が強く示唆された。さて、GI-1 の IFN- γ 処理による LAK 細胞の GI-1 に対するキラー活性の低下が観察された。標的細胞の IFN- γ 処理により natural killer (NK) 細胞に対する感受性の低下が知られており^{35, 40)}、また LAK 細胞が activated NK 細胞であるという概念も提唱されており⁴⁵⁾ われわれの実験結果と符合するものと考えられる。

抗原およびマイトジェンの刺激による、Tリンパ球の増殖過程において、IFN- γ が産生され、IL-2 がこのような免疫応答による IFN- γ の産生を制御しているという報告がなされている^{9, 17, 36)}。われわれの CTL クローンのうち TcGI-7, 11, 12 の各種刺激による IFN- γ 産生能を調べたが、GI-1 による抗原刺激および IL-2 による刺激では産生が認められず、マイトジェンである phytohemagglutinin による刺激により IFN- γ の産生がみられた (データ未提示)。

近年、悪性腫瘍に対する治療法として養子免疫療法が注目を浴びている。Rosenberg 等は、抗腫瘍エフェクター細胞として LAK 細胞を用いているが³²⁾、確かにエフェクター細胞の誘導の簡便性という観点からは

養子免疫療法に用いやすい細胞群であるが、その標的的特異性 (正常細胞は本当に攻撃をしないのか) の検討が必要と考えられる。また IL-2 のみでは LAK 細胞の長期培養は困難である。われわれの CTL クローンも培養を続けるうちに、その増殖能が劣化した。TcGI-3 のみは樹立後8ヶ月以上にわたり、活発な増殖を続けており、そのキラー活性を維持している。またこのクローンは調べたかぎり、アロ抗原との反応性も認めず、綿密にその標的的特異性を検討すれば、自家脳腫瘍のみならず、他家脳腫瘍の治療にも用いる可能性もある。この際に、IFN- γ 等の biological response modifier の併用等さらに研究開発が望まれるところである。

さて、今回われわれの樹立した CTL クローンは標的的特異性、キラー活性、細胞表面抗原、細胞障害機構における HLA class-I 分子の必要性等多くの細胞免疫学的特性において heterogeneity を示していた。また生体内における腫瘍細胞は株化細胞より更に heterogeneous な細胞生物学的特性を有するものと考えられる。担腫瘍生体内においては、これら CTL のほか、ヘルパー、サブプレッサー T 細胞、NK 細胞、マクロファージ等の免疫担当細胞が、腫瘍細胞に対して、ある面では synergistic に、またある面では、antagonistic に作用し、複雑な免疫ネットワークを形成していると考えられる。生体内におけるこのような複雑な免疫応答を解明し、更に治療への展望を考えるには、今回のクローンレベルでの解析を進展させ、より総合的な研究が必要であると考えられる。

結 語

腫瘍細胞上のみ存在し、正常細胞には存在しない構造、即ち腫瘍特異抗原もしくは腫瘍関連抗原を解析することは、腫瘍免疫を考えるに際して重要な意味があると考えられる。生体内における抗腫瘍免疫を司る細胞性免疫に着目し、グリオサルコーマ患者末梢リンパ球より11個の T 細胞クローンを樹立し、これらにより認識される腫瘍抗原の解析を行った。11個の T 細胞クローンのうち、2個は自家脳腫瘍株 (GI-1) および他家脳腫瘍株のみに細胞障害活性を示した。7個は脳腫瘍株以外に HeLa 細胞にも細胞障害活性を示し、1個はこの他さらに広い標的的特異性を示した。残り1個はいかなる細胞に対しても、障害活性を示さなかった。この結果より GI-1 細胞表面上には、これらキラー

T 細胞クローンにより認識される腫瘍関連抗原が少なくとも3種類存在することがわかった。また調べたヒト脳腫瘍細胞株4種類には、その膜表面上に、これらキラー T 細胞クローンにより認識される共通抗原が存在することがわかった。これらクローンの細胞表面抗原はいずれも CD3 陽性であったが、あるものは CD4 陽性、CD8 陰性であり、他のものは CD4 陰性、CD8 陽性であった。自家脳腫瘍細胞株 GI-1 を IFN- γ で前処理することにより、これらキラー T 細胞クローンの細胞障害活性が増強されたが、その機構は、同処理により GI-1 細胞表面上の、これらクローンにより認識される腫瘍関連抗原の発現が増強したことによると考えられた。

稿を終るにあたり、御指導御校閲を賜りました京都大学脳神経外科菊池晴彦教授に深甚なる感謝の意を表します。また、終始御指導頂きました山下純宏助教授に深謝の意を表します。そして、実験に関し直接御指導御協力頂きました京都大学ウイルス研究所病理部門花岡正男教授、難波雄二助教授に深謝いたします。また実験に用いた細胞株 (GI-1) を樹立し、御協力を頂いた京都大学脳神経外科岩崎孝一学兄に感謝いたします。

References

- 1) Abo T, Balch CM: Characterization of HNK-1⁺ (Leu-7) human lymphocytes. II. Distinguishing phenotypic and functional properties of natural killer cells from activated NK-like cells. *J Immunol* 129: 1758-1761, 1982.
- 2) Anichini A, Fossati G, Parmiani G: Clonal analysis of cytotoxic T-lymphocyte response to autologous human metastatic melanoma. *Int J Cancer* 35: 683-689, 1985.
- 3) Appuzo MLJ, Mitchell MS: Immunological aspects of intrinsic glial tumors. *J Neurosurg* 54: 331-337, 1981.
- 4) Barnstable C, Bodmer W, Brown G, et al: Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes. HLA and other human cell surface antigens. New tools for genetic analysis *Cell* 14: 9-18, 1978.
- 5) Brooks WH, Latta RB, Mahaley MS, et al: Immunobiology of primary intracranial tumors. *J Neurosurg* 54: 331-337, 1981.
- 6) Brunner KT, Engers HD, Cerottini JC: 51 Cr-release assay as used for the quantitative measurement of cell-mediated cytotoxicity in vitro. In *in vitro methods in cell-mediated and tumor immunity*. BR bloom and JR David, editors. Academic Press Inc. New York. 423-428, 1976.
- 7) Carrel S, Schmidt-Kessen A, Giuffre Laura:

- Recombinant interferon- γ can induce the expression of HLA-DR and -DC on DR-negative melanoma cells and enhance the expression of HLA-ABC and tumor-associated antigens. *Eur J Immunol* 15: 118-123, 1985.
- 8) De Vries JE, Spitz H: Cloned human cytotoxic lymphocyte (CTL) lines reactive with autologous melanoma cells. I. In vitro generation, isolation and analysis to phenotype and specificity. *J Immunol* 132: 510-519, 1984.
 - 9) Farrar WL, Johnson HM, Farrar JJ: Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2. *J Immunol* 126: 1120-1125, 1981.
 - 10) Fossati G, Anicini A, Parmiani G: Melanoma cell lysis by human CTL clones: Differential involvement of T3, T8 and HLA antigens. *Int J Cancer* 39: 689-694, 1987.
 - 11) Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, et al: 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.
 - 12) Heron I, Hokland M, Berg K: Enhanced expression of beta 2-microglobulin and HLA antigens on human lymphoid cells by interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 6215-6219, 1978.
 - 13) Hersey P, MacDonald M, Schibeci S, et al: Clonal analysis of cytotoxic T lymphocyte (CTL) against autologous melanoma. Classification based on phenotype, specificity and inhibition of monoclonal antibodies of T cell structures. *Cancer Immunol Immunother* 22: 15-24, 1986.
 - 14) Ibayashi Y, Uede T, Kikuchi K: Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors: differential cytotoxicity of mononuclear cells from tumors of immune and nonimmune rats. *J Immunol* 134: 648-653, 1985.
 - 15) Itoh K, Tilden AB, Kumagai K, et al: Leu 11⁺ lymphocytes with natural killer (NK) activity are precursors of recombinant interleukin 2 (rIL2) induced activated killer (AK) cells. *J Immunol* 134: 802-807, 1985.
 - 16) Iwasaki K, Kikuchi K, Miyatake S, et al: Establishment and characterization of a cell line derived from a human gliosarcoma. In preparation for submission.
 - 17) Kasahara T, Hooks JJ, Daugherty SF, et al: Interleukin-2 mediated immune interferon (IFN γ) production by human T cells and T cell subsets. *J Immunol* 130: 1784-1789, 1982.
 - 18) Kedar E, Chriqui-Zeira E, Mitelman S: Methods for amplifying the induction and expression of cytotoxic response in vitro to syngeneic and autologous freshly-isolated solid tumors of mice. *Cancer Immunol Immunother* 18: 126-134, 1984.
 - 19) Kohler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predetermined specificity. *Nature (London)* 256: 495-497, 1975.
 - 20) Mazumder A, Grimm EA, Zhang HZ, et al: Lysis of fresh human solid tumors by autologous lymphocytes activated in vitro with lectins. *Cancer Res* 42: 913-918, 1982.
 - 21) Mazumder A, Grimm EA, Rosenberg SA: Characterization of the lysis of fresh human solid tumors by autologous lymphocytes activated in vitro with phytohemagglutinin. *J Immunol* 130: 958-964, 1983.
 - 22) Meuer SC, Schlossman SF, Reinherz EL: Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4⁺ and T8⁺ effector T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4590-4595, 1982.
 - 23) Morantz RA, Sham W, Cravioto H: Immune surveillance and tumors of the nervous system. *J Neurosurg* 49: 84-92, 1978.
 - 24) Moss DJ, Rickinson AB, Pope JF: Long term T-cell mediated immunity to Epstein-Barr virus in man. I. Complete regression of virus-induced transformation in cultures of sero-positive donor leukocytes. *Int J Cancer* 22: 662-666, 1978.
 - 25) Mukherji B, MacAllister TJ: Clonal analysis of cytotoxic T cell response against human melanoma. *J Exp Med* 158: 240-245, 1983.
 - 26) Plata F: Specificity studies of cytolytic T lymphocytes directed against murine leukemia virus-induced tumors: analysis by monoclonal cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 15: 1050-1062, 1984.
 - 27) Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, et al: Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4061-4065, 1979.
 - 28) Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, et al: A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic/suppressor subset previously defined by a heteroantiserum termed TH2. *J Immunol* 124: 1301-1305, 1980.
 - 29) Reinherz EL, Schlossman SF: The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 19: 821-827, 1980.
 - 30) Roberts TE, Shinton U, Moore M: Role of MHC class-I antigen and the CD3 complex in the lysis of autologous human tumors by T-cell clones. *Int J Cancer* 39: 436-441, 1987.

- 31) Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *New Engl J Med* 313: 1485-1492, 1985.
- 32) Ryser JE, Cerottini JC, Brunner KT: Generation of cytolytic E lymphocytes in vitro. IX. Induction of secondary CTL responses in primary long-term MLC by supernatants from secondary MLC. *J Immunol* 120: 370-377 1978.
- 33) Spits H, Ijssel H, Terhorst C, et al: Establishment of human T lymphocyte clones highly cytotoxic for an EBV-transformed B cell line in serum free medium: Isolation of clones that differ in phenotype and specificity. *J Immunol* 128: 95-99, 1982.
- 34) Stejskal V, Lindberg S, Holm G, et al: Differential cytotoxicity of activated lymphocytes on allogeneic and xenogenic target cells. II. Activation by phytohemagglutinin. *Cell Immunol* 8: 82-92, 1973.
- 35) Taniguchi K, Peterson M, Hoglund P: Interferon induces lung colonization by intravenously inoculated B16 melanoma cells in histocompatibility complex antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3405-3409, 1987.
- 36) Torres BA, FarrarWL, Johnson HM: Interleukin 2 regulates immune interferon (IFN γ) production by normal and suppressor cell cultures. *J Immunol* 128: 2217-2219, 1982.
- 37) Van de Griend RJ, Giphart MJ, Van Krimper BA, et al: Human T-cell clones exerting multiple cytotoxic activities show heterogeneity in susceptibility to inhibition by monoclonal antibodies. *J Immunol* 133: 1222-1229, 1984.
- 38) Verhagen-Levvalle M, Kuwata T, Zhang ZX: 2-5A synthetase activity induced by interferon α , β and γ in human cell lines differing in their sensitivity to the anticellular and antiviral activities of those interferons. *Virology* 117: 425-434, 1982.
- 39) Vose BM, Riccardi C, Bonnard GD, et al: Limiting dilution analysis of the frequency of human T cells and large granular lymphocytes proliferating in the response to interleukin 2. II. Regulatory role of interferon on proliferative and cytotoxic precursors. *J Immunol* 130: 768-772, 1983.
- 40) Wallach D: Interferon-induced resistance to the killing by NK cells: A preferential effect of INF- γ . *Cell Immunol* 75: 390-395, 1982.
- 41) Wikstrand CL, Bigner DD: Immunobiologic aspects of the brain and human gliomas. Case reports. *Am J Pathol* 98: 517-657, 1980.
- 42) Yamasaki T, Handa H, Yamashita J, et al: Specific adoptive immunotherapy with tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte clone for murine malignant gliomas. *Cancer Res* 44: 1776-1783, 1984.
- 43) Yssel H, Spits H, De Vries JE: A cloned human T cell line cytotoxic for autologous and allogeneic B lymphoma cells. *J Exp Med* 160: 239-254, 1984.