

実験脳腫瘍におけるナチュラルキラー細胞及び サプレッサー T 細胞に関する研究

京都大学医学部脳神経外科学教室 (指導: 半田 肇教授)

徳 力 康 彦

[原稿受付: 昭和56年9月1日]

Lymphocytes Reactivities Against Rat Neurogenic Tumor: Natural Killer and Suppressive Activities.

YASUHIKO TOKURIKI

Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School
(Director: Prof. Dr. HAJIME HANDA)

The cell-mediated immune responses between tumor cells (T_1) and lymphocytes obtained from spleen, thymus, lymphnode and peripheral blood lymphocytes were examined sequentially using direct microcytotoxicity test after subcutaneous tumor cell inoculation. T_1 tumor, neuroinoma, was induced in syngeneic rat by transplacental administration of Ethylnitrosourea and showed immunological enhancement in active protection test.

Spleen lymphocytes showed not only natural killer (NK) activity but also suppressive activity. Thymic and lymphnode lymphocytes showed killer activity. Peripheral blood lymphocytes showed mainly NK activity and partially killer activity.

In the presence of tumor antigen, suppressive activity and killer activity were activated via memory cells. When the tumor antigen was weak, suppressive activity was activated earlier than killer activity, 3 days after inoculation in suppressive activity and 7 days in killer activity respectively. This suppressive activity inhibited not only killer activity but also NK activity which was thought to be identical with prethymic cells. On advancing of the tumor development, memory cells were neutralized by excessive antigen, and suppressive activity was decreased earlier than killer activity, which suggested that suppressive activity was intermediated by shorter life span lymphocytes than killer activity. NK activity was also decreased in terminal stage.

When the tumor antigen was strong, which was examined using earlier passaged tumor, suppressive activity was hard to be activated and killer activity was strongly activated.

Key words: Immunological enhancement, Microcytotoxicity test, Natural killer cell, Suppressor cell, Intracerebral inoculation.

索引語: Immunological enhancement, 細胞障害試験, ナチュラルキラー細胞, サプレッサー細胞, 脳内接種.

Present address: Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan.

When inoculated in the brain tissue, which was thought to be different site of the lymphoreticular response by the host, suppressive activity was not activated at all and killer activity was strongly activated, and antigenicity caused no differences in cytotoxicity.

I believe it will be required in tumor immunotherapy to increase NK and killer activity, more over to control this suppressive activity.

諸 言

腫瘍に対する細胞性免疫反応は、特に生体内では非常に複雑な様相を呈しており、多くの因子がその反応に影響を与えているものと思われる。また用いる腫瘍により、あるいは感作の方法により違った結果のみられる事も多く、総合的に理解する事は困難な場合が多い。従って、細胞性免疫反応の解析には、より単純化して、反応の1つ1つを明らかにし、その上で総合的に判断する必要がある。

腫瘍に対する細胞性免疫反応の中には、腫瘍に対して障害性に働くもののみではなく、むしろ促進的に働く反応も報告されており、この反応の解析が、腫瘍に対する細胞性免疫反応を理解する上に、さらには、腫瘍に対する免疫治療を考える上で、おおいに役立つことは十分考えられる。

今回実験に用いた T₁ 腫瘍は、in vivo の active protection test で、特に腫瘍接種後早期に immunological enhancement の現象をみた腫瘍で、この enhancement は、tumor neutralization test でも、その enhancing activity は transfer された²⁶⁾。この immunological enhancement に関しては、既にいくつかの報告はあるが、その解析には定説をみない^{1,2)}。

Baldwin R.W. 等 (1976)²⁾ は、この immunological enhancement の原因として、液性因子の中に blocking factor があり、その為に、細胞性免疫の障害性 (殺細胞能力) が抑制されるのではないかと推論している。確かに T₁ 腫瘍でも、抗体依存性細胞免疫反応 (ADCC) の検討に際して、その可能性は示唆されたが (未発表)、一方では、細胞性免疫反応そのものに、障害性のみでなく、抑制的に働く suppressive な作用を考え、これが enhancement の一役を担っているという考えも有力である。

本研究では、細胞性免疫反応に限り、そのリンパ球の動態を知る事により immunological enhancement の in vitro の解析を試みた。パラメーターには、direct microcytotoxicity test を用いた。これは、短時間に結

果が得られる上に、少量の材料で行なえる利点がある。

実験材料及び方法

ラット：Denmark, Fibiger 研究所より供与を受けた Wistar/Fibiger 系ラットを用いた。既に100代以上近交系交配を繰り返したもので、conventional clean room で維持したものである。実験に際しては、6~12週令、体重 200~350 g のものを用いた。

腫瘍：1977年、織田等により、ethylnitrosourea 経胎盤投与 (40 mg/kg, 21th day of pregnancy) により、Wistar Fibiger 系ラットに誘発された neurinoma (T₁) を用いた²²⁾。今回用いたのは、皮下接種により60代以上継代移植を経た世代 (old T₁) であるが、一部比較実験として、凍結保存中の4代目腫瘍 (early T₁) も用いた。T₁ 腫瘍の TD 100 は 1×10^4 cells で、 1×10^6 cells を皮下接種した場合、7~10日で接種部位に小豆大の腫瘍を触知するようになり、4週~5週で死に至る。T₁ 腫瘍の抗原性に関しては、織田等が migration inhibition test を用いて報告しており^{23,24)}、in vivo における immunological enhancement の現象に関しては著者等が既に報告した^{26,27)}。

感作法：超音波破壊腫瘍細胞を毎週1回、3週間にわたり、側背部皮下に注入する事により感作ラットを作成した。すなわち超音波細胞破壊器 (Konets Co. Lit. USA) を用い、皮下より摘出した腫瘍塊を細切し、Collector (Bellco Grass, Inc. USA) を用いて #30 の金属 mesh に細胞を分離した。試験管の中で 1×10^7 cells/ml になるように生理食塩水を用いて調整し、超音波細胞破壊器の端子を試験管内に挿入、15 KHz、30分間超音波を作用させたものを感作液とした。超音波の作用時間が30分以下では、腫瘍細胞の破壊は不完全である (Table 1)。感作液は -20°C で凍結保存した。感作に際しては、1回につき感作液 0.1 ml (1×10^6 細胞分) を用いた。

担癌ラット：皮下接種と脳内接種の場合について検討した。皮下接種では trypsin (阪大徹研) を用いて分離した T₁ 細胞を生理食塩水にて 1×10^7 /ml とし、そ

Table 1. Effect of Ultra-sonic Cell Disruption.

5 min.	65%
10 min.	72%
15 min.	78%
20 min.	84%
25 min.	89%
30 min.	98%
35 min.	98%
60 min.	99%

の $10\mu\text{l}$ (1×10^5 細胞分) を頸部皮下に接種した。この際、皮下結合織内に正確に等量が接種されるようにするためエーテル麻酔下で行なった。

脳内接種の場合は、直接接種と経頸動脈接種の2つの方法について検討した。

直接接種では、皮下接種の時と同様に作成した T_1 細胞浮遊液を、Hamilton syringe を用いて直接頭蓋を穿通し、頭蓋外縁より 2mm の深さに $10\mu\text{l}$ (1×10^5 細胞分) を注入した。この際、脳室内へ腫瘍細胞がもれるのを防ぎ、なるべく脳実質内に腫瘍を作るために、両眼窩後縁を結ぶ線上より、Lobus olfactorius の方向に向けて穿刺した。

経頸動脈接種の場合は、頸部で、総頸動脈、内、外頸動脈を露出、外頸動脈を結紮切断し、その断端部よりカニューレを内頸動脈に挿入し腫瘍細胞を注入した。この時、A. stapedius はクリッピングを行ない、腫瘍細胞が総て頭蓋内に流れるようにした (Fig. 1)。

脳内接種の場合も、エーテル麻酔下で行なった。

超音波脳破壊：腫瘍を脳実質内に生着させる目的で、経頸動脈腫瘍細胞注入に先立って、注入側前頭骨に barr で小孔を設け、超音波細胞破壊器の端子を硬膜外に接し、1分及び5分間、15 KHz の超音波を作用させた。

リンパ球：脾臓リンパ球、胸腺リンパ球、リンパ節リンパ球、及び末梢血リンパ球を使用した。各ラットより脾臓、胸腺、リンパ節を摘出し、細切後 Collector を用いて個々のリンパ球に分離し、phosphate buffer saline (PBS) で2回洗浄した。末梢血リンパ球は、心臓穿刺によりヘパリン採血し、ラット1匹あたり約10mlの血液を得、Böyumの方法³⁾によりリンパ球を分離した。すなわちPBSで2倍に希釈した末梢血を、4mlのFicoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden)の上に3mlずつ静かに重畳し、1,600 r.p.m.

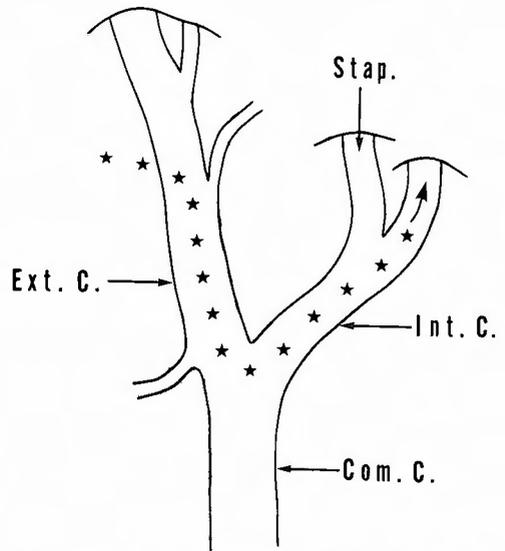


Fig. 1. Illustration of the transcarotid tumor inoculation.

Com. C.: common carotid artery, Int. C.: internal carotid artery, Ext. C.: external carotid artery, Stap.: stapedial artery, Stars (★) and arrow (▲): route of the tumor cells suspension.

(H-103R Kokusan), 400G で 4°C 30分間遠沈後、中間層を採取し、PBS で2回洗浄した。平均リンパ球採取率は70%であった。

脾臓リンパ球には赤血球が多量に混じっており、これは1ml蒸留水を40秒間作用させ、hypotonic shock にて除いた。また、担癌末期になると、末梢血リンパ球採取においても、中間層に接して赤血球成分が多量に存在し、純粋なリンパ球を集める事は不可能であったため、これもhypotonic shock にて赤血球を破壊した。

プレート作成：培養系 T_1 細胞は、皮下腫瘍を摘出、細切後、culture bottle 内で2代継代培養したものをを用いた。培養液はEagle's MEMで、 56°C 30分間の熱処理で不活化した10% foetal calf serum (FCS) を加えた。細胞採取には5mlのtrypsinを加え、 37°C で5分間反応後遠沈し、PBSで2回洗浄した。この操作によるviabilityはトリパンブルー法で92%であった。

Microcytotoxicity testには、Falcon #3034 microtest plate (Falcon Plastic Co. Lit.) を用いた。20% FCS 加MEMで $2 \times 10^5/\text{ml}$ に濃度調整した T_1 細胞を、micro titer pipette を用いて $10\mu\text{l}$ (2×10^3 cells/well) ずつ各

well に注入し, 37°C, 5% CO₂ の humidified な培養器内で2日間培養してから test に用いた。

基礎実験では, 血清の濃度は5%, 10%, 20%について調べたが, plate に用いる場合は20%必要であり, ばらつきが少なく一定した値を示した。また各 well あたりの腫瘍細胞数は, 腫瘍細胞の大きさと, Image Lyser (浜松テレビ製) の解像力から, 1~2×10³ cells/well が至適であり, これ以上多いと腫瘍細胞が重なり合い, 正確な算出が不可能であった。さらに, 培養期間が2日より少ないと, 固定の操作の際に, 附着した生細胞がはがれ易いため, 最低2日, 場合によっては3日間の培養を行なった。

Microcytotoxicity test: 高杉法³⁴⁾によって検討した。2日間培養した well の培養液を捨て, 各リンパ球を20% FCS 加 MEM で規定の濃度に調整し各 well に加えた。TL 比は10 (リンパ球: T₁ 細胞=10:1), 100, 200で検討したが, 実験2では TL 比10と100, 実験3以降は TL 比100のみで調べた。コントロールには培養液のみを加えた。これ等の plate を更に18時間培養後, plate を反転し更に30分間培養した。次いで plate を反転したまま手で振り, 培養液を捨てた。この操作がないと, 死滅した腫瘍細胞やリンパ球が残ってしまい, 底部に生着した腫瘍細胞数の測定の際に支障をきたす為である。ただちに 37°C の PBS で1回洗浄し, 底部に残った培養液の蛋白成分を稀釈したのち, pure ethanol で5分間固定, May Grünwald-Giemsa で染色し, Image Lyser で計測した。コントロールの計測数は350~600であり, 350以下の場合, 一連の実験操作に何等かの障害因子が加わったものと考え除外した。

Sham test: 脳内直接腫瘍接種の実験では, 接種による脳実質の機械的損傷及び注入による圧迫の影響をみるため, Hamilton syringe を用いて刺入のみした場合と, 生理食塩水を 10 μl 注入した場合について調べた。

統計処理: 細胞障害性は, 培養液のみで培養したコントロールに対する, リンパ球加培養の細胞数の比で示した。

cytotoxic index (CI) は

$$CI = 1 - \frac{\text{test well の細胞数の平均値}}{\text{コントロール well の細胞数の平均値}}$$

として算出し

$$\% \text{ of cytotoxicity} = CI \times 100$$

として図上に表示した。

各 test の標準偏差を計算し, Student's t-test で P が 0.05以下のものを有意とした。

結 果

実験1: コントロール (未処理) ラットの, 各リンパ球の cytotoxicity は Table 2 の如くである。TL 比10の場合は, リンパ節リンパ球で42.8%, 末梢血リンパ球で27.1%と有意な障害性をみた。TL 比100になると, 脾臓リンパ球では89.9%, リンパ節リンパ球で58.5%, 末梢リンパ球で83.2%と, 脾臓, 末梢リンパ球で強い細胞障害性をみた。TL 比200でも同様の傾向がみられた。

次に, 未処置ラットの障害性に対する, 感作ラット, 担瘤ラットの障害性の比較を Table 3 (a, b, c, d) に示した。

脾臓リンパ球 (Table 3a) では, TL 比10の時は, 感作状態, 担瘤状態共に, コントロールとの間に著明な差はみられないが, TL 100で調べると, 感作状態ではむしろ障害性は低下し, 担瘤状態では, 再びコント

Table 2. Direct microcytotoxicity test comparing between untreated (Ct) rat lymphocytes from each organ.

Effector cells	TL ratio	Mean values of survival tumor cells	% of cytotoxicity	p-value
control		251.4 ± 62.1		
Ct Sp	10	195.6 ± 42.8	22.2	>0.5
Ct Th	10	156.6 ± 23.8	37.8	<0.2
Ct Ln	10	144.1 ± 65.9	42.8*	<0.005
Ct PBL	10	183.2 ± 48.1	27.1	<0.01
control		208.3 ± 48.1		
Ct Sp	100	21.2 ± 16.7	89.9*	<0.005
Ct Th	100	170.6 ± 52.3	18.1	>0.5
Ct Ln	100	86.5 ± 73.2	58.5*	<0.05
Ct PBL	100	35.2 ± 10.2	83.2*	<0.01
control		282.5 ± 67.2		
Ct Sp	200	3.0 ± 0.8	99.9*	<0.001
Ct Th	200	306.8 ± 64.3	-8.6	<0.4
Ct Ln	200	215.2 ± 51.8	23.9	>0.5
Ct PBL	200	41.8 ± 19.6	85.2*	<0.005

Sp: spleen cells, Th: thymic cells, Ln: lymph-node cells, PBL: peripheral blood lymphocytes.

(*) means statistical significance which p-value is less than 0.05. % of cytotoxicities are calculated in a comparison to the control which tested the medium only.

Table 3. Direct microcytotoxicity test comparing between the three states using spleen cells (a), thymic cells (b), lymph-node cells (c) and peripheral blood lymphocytes (d).

a					b				
Effector cells	TL ratio	Mean values of survival tumor cells	t-value	p-value	Effector cells	TL ratio	Mean values of survival tumor cells	t-value	p-value
Ct Sp	10	195.6±42.8			Ct Th	10	156.3±23.8		
Se Sp	10	205.6±85.6	0.209	>0.5	Se Th	10	162.5±58.3	0.219	>0.5
Tu Sp	10	128.1±54.5	1.882	<0.1	Tu Th	10	170.0±74.4	0.486	>0.5
Ct Sp	100	21.2±16.7			Ct Th	100	170.6±52.3		
Se Sp	100	82.6±41.7	3.361*	<0.01	Se Th	100	51.5±22.9	4.530*	<0.005
Tu Sp	100	32.0±23.1	0.948	<0.4	Tu Th	100	79.6±71.7	2.426*	<0.05
Ct Sp	200	3.0±0.8			Ct Th	200	306.8±64.3		
Se Sp	200	27.1±10.8	4.917*	<0.001	Se Th	200	143.4±72.8	3.259*	<0.01
Tu Sp	200	9.0±3.7	2.436*	<0.05	Tu Th	200	187.3±78.4	3.083	<0.025

c					d				
Effector cells	TL ratio	Mean values of survival tumor cells	t-value	p-value	Effector cells	TL ratio	Mean values of survival tumor cells	t-value	p-value
Ct Ln	10	144.1±65.9			Ct PBL	10	183.2±48.1		
Se Ln	10	128.1±26.0	0.541	>0.5	Se PBL	10	154.7±52.6	0.976	<0.4
Tu Ln	10	85.1±32.3	2.071	<0.1	Tu PBL	10	216.3±86.9	1.877	<0.1
Ct Ln	100	86.5±73.2			Ct PBL	100	35.2±10.2		
Se Ln	100	19.0±5.8	1.455	<0.2	Se PBL	100	31.8±14.3	0.215	>0.5
Tu Ln	100	53.4±16.4	1.366	<0.4	Tu PBL	100	168.5±98.1	3.198*	<0.025
Ct Ln	200	215.2±51.8			Ct PBL	200	41.8±19.6		
Se Ln	200	105.9±10.6	4.602*	<0.001	Se PBL	200	32.6±16.2	1.856	<0.1
Tu Ln	200	139.2±72.3	1.859	<0.1	Tu PBL	200	124.6±92.5	4.582*	<0.005

Ct: controlled state, Se: sensitized state, Tu: tumor-bearing state.

(*) means statistical significance which p-value is less than 0.05. t-values and p-values are calculated in a comparison to the controlled state which tested mixed with control rat lymphocytes.

ロールに近い高い障害性がみられた。TL比200でも同様の傾向が有意にみられた。

胸腺リンパ球 (Table 3b) では、やはり TL比10では有意の差はみられないが、TL比を100以上で調べると、感作、担瘤の両方共に有意の障害性の上昇がみられた。

リンパ節リンパ球 (Table 3c) でも、胸腺リンパ球と同じ傾向がみられ、TL比を100以上にすると、感作状態、担瘤状態共、細胞障害性は上昇した。

末梢リンパ球 (Table 3d) では、TL比100以上の場合、感作状態では、コントロール同様高い障害性を示したのに対し、担瘤状態になると障害性は著明に低下した。TL比200でも傾向は同じであった。

以上、4種のリンパ球の3種の状態に於る関係を図示すると Fig. 2 (a, b, c, d) のようになる。すなわち、未処置ラットの脾臓リンパ球、及び末梢リンパ球には、強い細胞障害性があり、感作状態になると、末梢リンパ球は同様の強い障害性がみられたが、脾臓リンパ球ではむしろ低下した。胸腺、リンパ節リンパ球では、感作により障害性は上昇した。担瘤状態では、脾臓リンパ球は再び高い障害性を示し、胸腺、リンパ節リンパ球でも高い障害性を示したが、末梢リンパ球では低下した。

ここで、胸腺リンパ球とリンパ節リンパ球は非常に類似したパターンを示したので、実験2以降は、リンパ節リンパ球は除外した。また、TL比100と200の間

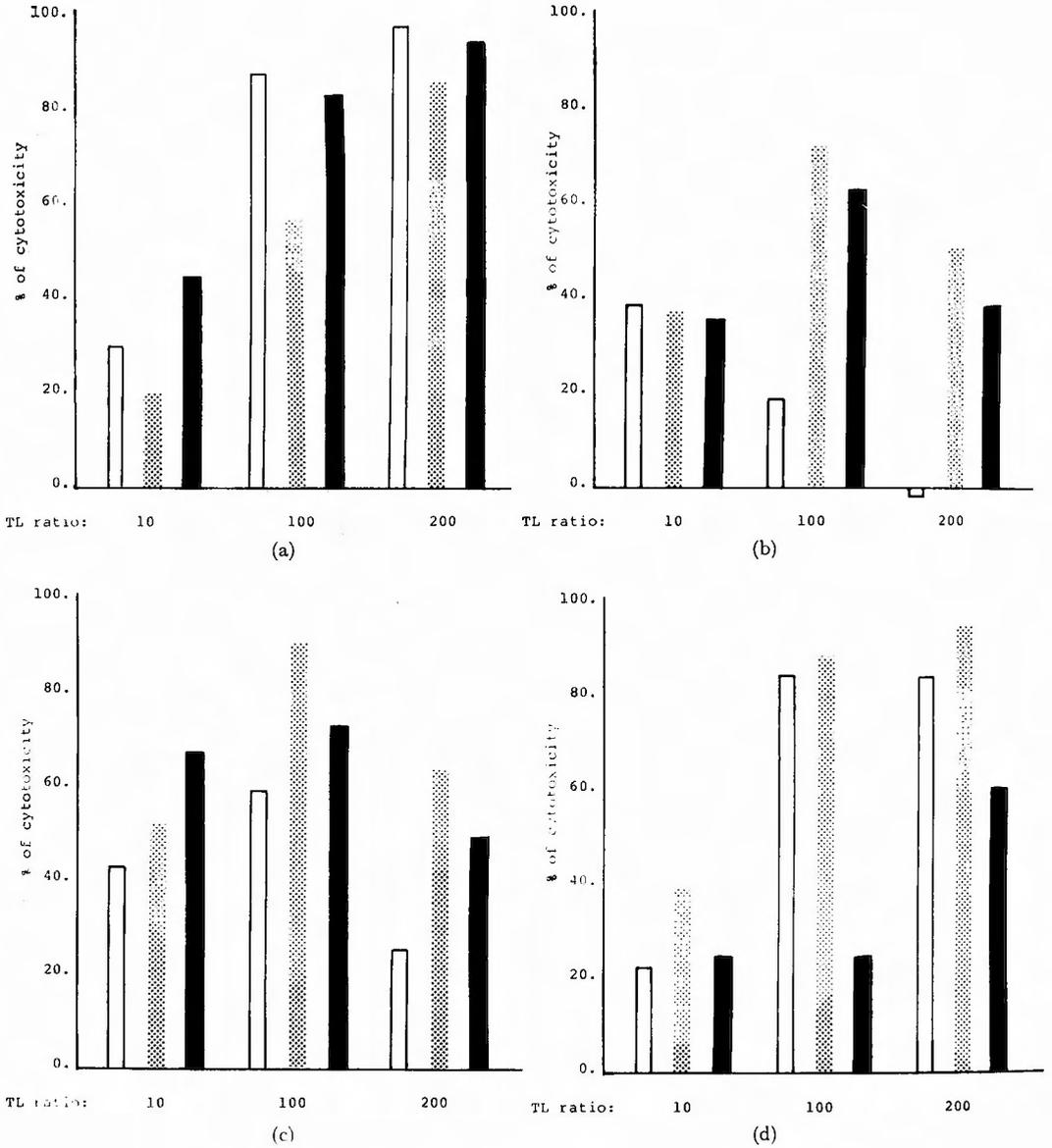


Fig. 2. Representation in figures of the table-3 (a), (b), (c) and (d).

open bar : controlled rat lymphocytes
 dotted bar : sensitized rat lymphocytes
 black bar : tumor-bearing rat lymphocytes

には差は認められなかったので、実験2は TL 比10と100で検討した。

実験2：実験1で用いた担癌ラットは、腫瘍接種後3週経た、比較的末期に近いものであり、より初期のリンパ球の動態をみるため、腫瘍接種後の各臓器のリンパ球の障害性を経時的に調べた。

T_i細胞 1×10^6 個を皮下に接種後、3日、7日、10日、14日、21日、28日、及び28日以降にそれぞれ、脾臓、胸腺、末梢リンパ球を採取し、細胞障害性を測定した結果、TL 比10では、各臓器リンパ球とも、未処理ラットのリンパ球との差はほとんどみられず、標準偏差も大きかった。

TL比100の場合 (Fig. 3a, b, c), 脾臓リンパ球では、既に接種後3日目より細胞障害性の低下がみられ、7日目でも55%程度と低いが、10日目には95%と、ほぼ未処置ラットの細胞障害性にまで戻る。以後、軽度ながら低下し始め、4週目から末期になると約60%となった (Fig. 3a)。

胸腺リンパ球では、7日目までは未処置ラットと同程度であるが、10日目になると60%程度まで上昇し、

軽度の下降はあるものの、末期まであまり変化はみられなかった (Fig. 3b)。

末梢リンパ球では、3日目は未処置ラットと変わりがなく、7日目で95%と障害性は高くなるが、10日目になると急速に低下し、以後末期になっても低いままであった (Fig. 3c)。

以上、各臓器別のリンパ球の細胞障害性の経時的推移をみると、実験1の感作群のパターンは、実験2の

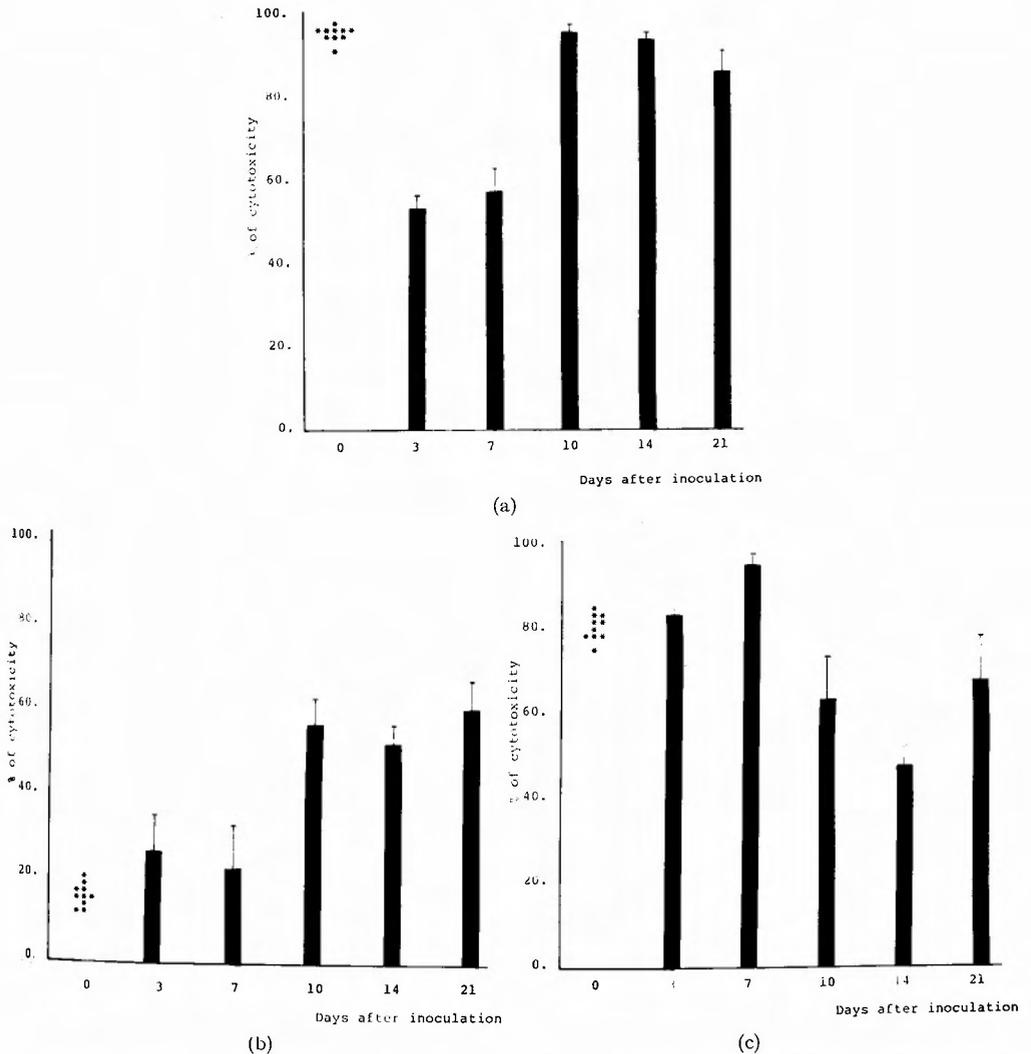


Fig. 3. Cytotoxic activities of spleen cells (a), thymic cells (b) and peripheral blood lymphocytes (c) from tumor-bearing rat during the course of tumor development. (*) shown at day 0 represent mean values of cytotoxicities obtained from controlled rat at each of the experiments. % of cytotoxicities are calculated in a comparison to the control which tested medium only at each of the experiments.

接種後初期の結果に類似している事が分った。すなわち、脾臓リンパ球、及び末梢リンパ球では3日目、ないし7日目、胸腺リンパ球では7日目ないし10日目の結果に類似していた。

実験3:皮下に移植した腫瘍を組織学的にみると、腫瘍の周囲に著明なリンパ網内系細胞浸潤がみられるが、脳内に移植した場合はこのような反応はみられない (Fig. 4)。そこで脳内に腫瘍を移植した場合の各リンパ球の細胞障害性の経時的变化を調べ、皮下移植の場合と比較検討した。

脳内移植の方法としては、直接穿刺で腫瘍細胞を接種する直接接種法が、最も簡便で安定した移植腫瘍を得やすい。ただ穿刺という機械的刺激により、一時的にせよリンパ網内系細胞浸潤がみられるのが、この方法の問題点である。

以下、 T_1 細胞を頸部皮下に接種した群を皮下群、脳内に直接接種した群を脳接種群とする。

脾臓リンパ球では、皮下群が接種後3日、7日目で細胞障害性が50~60%程度にまで低下したのに対し、脳接種群では90~95%と、未処置ラットとほぼ同じ障害性がみられた。10日目になると両群の間に差は認められなくなり、3週以降末期に近づくにつれ、皮下群同様、脳接種群でも障害性は低下した (Fig. 5a)。

胸腺リンパ球では、皮下群、脳接種群とも類似した経過を示すが、10日目までの早期では脳接種群の方が高い障害性を維持し、10日目以降では皮下群の方が高い障害性を示す傾向がみられた (Fig. 5b)。

末梢リンパ球では、皮下群が7日目まで障害性が軽度上昇し、10日目以降急激に低下するのに対し、脳接種群では10日目までは一定した値を示した。14日目以降は皮下群同様低下し、両者の間に差は認められな



Fig. 4. 7 days after direct intracerebral inoculation. T_1 cells around a capillary. Lympho-reticular cell reaction was not observed.

H. & E. $\times 400$

った (Fig. 5c)。

実験4:脳内直接接種法の問題点、すなわち一時的にでも、リンパ網内系細胞浸潤がみられるという現象を除外し、より生理的に脳実質内に腫瘍を作成するため、経頸動脈腫瘍接種を試みたが、この方法はまだ確立されていない。今までのところ、内頸動脈より腫瘍細胞を注入しても、脳実質内に腫瘍を作ることは不可能であり、肺の転移巣に続いて、注入側眼窩内、注入側錐体骨、次いで下垂体、頭頂頭蓋骨、脳室内等に腫瘍生着をみたのみである。肺への転移巣は、注入細胞を腫瘍塊とする事により防止できるようになったが、腫瘍生着部位はやはり眼窩等であり、実質内腫瘍はみられなかった。

経頸動脈接種の場合の細胞障害性については、接種後1週目と2週目に調べた結果、皮下接種と脳内直接接種の中間的な値を示したが、統計的処理では有意差は得られなかった (Fig. 6a)。

脳実質内腫瘍作成の次の試みとしては、虚血病変を作っておくか、あるいは硬膜外より超音波を作用させ脳脊髄関門を破壊しておいて、頸動脈より腫瘍を注入する方法が推測される。後者に関しては、5例中1例に脳実質内腫瘍の生着をみたが、確実に脳実質内のみ

に腫瘍を作る方法はまだ完成されていない。この超音波脳脊髄関門破壊後の腫瘍細胞注入の場合の細胞障害性については、経頸動脈接種と脳内直接接種の中間的な値を示す傾向はみられたが、やはり有意差は得られなかった (Fig. 6b)。

実験5:実験3・4では、接種部位の違いからみられるリンパ網内系細胞反応の違いより、細胞障害性の差をみたが、同じ腫瘍の世代の違いより、その腫瘍の抗原性の差に注目し^{13,25)}、 T_1 腫瘍誘発後4代目の早期の腫瘍を用いて同様の実験を行なった。これをearly T_1 と表現する。Early T_1 の増殖曲線については、従来の実験に用いたold T_1 よりわずかに右方偏移がみられたのみであった。

脾臓リンパ球についてみると、皮下接種の場合、early T_1 では、接種後3日目、7日目でもold T_1 程著明な障害性の低下はみられなかった。10日目以降は、early, old 共ほぼ同じ傾向を示した。脳内接種の場合はearly, old の間に差はみられなかった (Fig. 7a)。

胸腺リンパ球では、皮下接種の場合、3日目では、early T_1 とold T_1 の間に差はないが、7日目では、early T_1 の方がold T_1 よりさらに高い細胞障害性を示し、この傾向は2週間目まで続いた。以後はむしろ

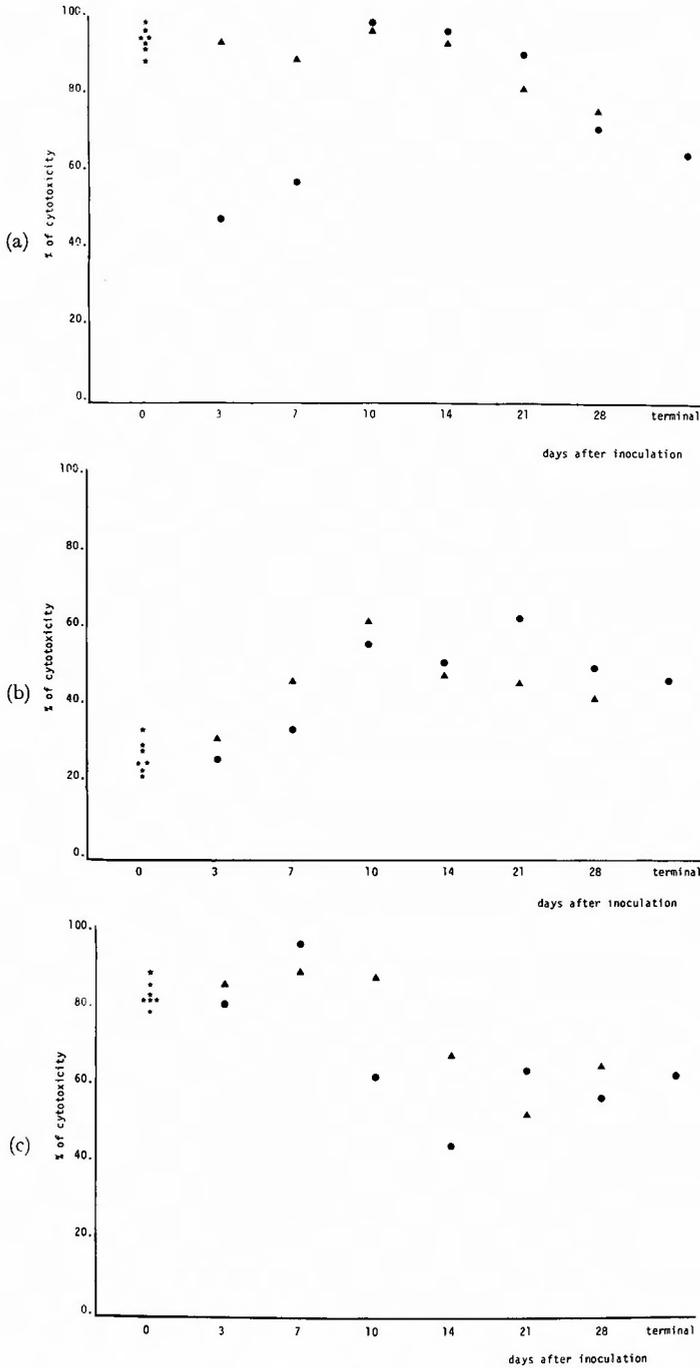


Fig. 5. Cytotoxic activity of spleen cells (a), thymic cells (b) and peripheral blood lymphocytes (c) from tumor bearing rat during the course of tumor development after subcutaneous inoculation (●) and intracerebral inoculation (▲). (★) shown at day 0 represent mean values of cytotoxicities obtained from controlled rat at each of the experiments.

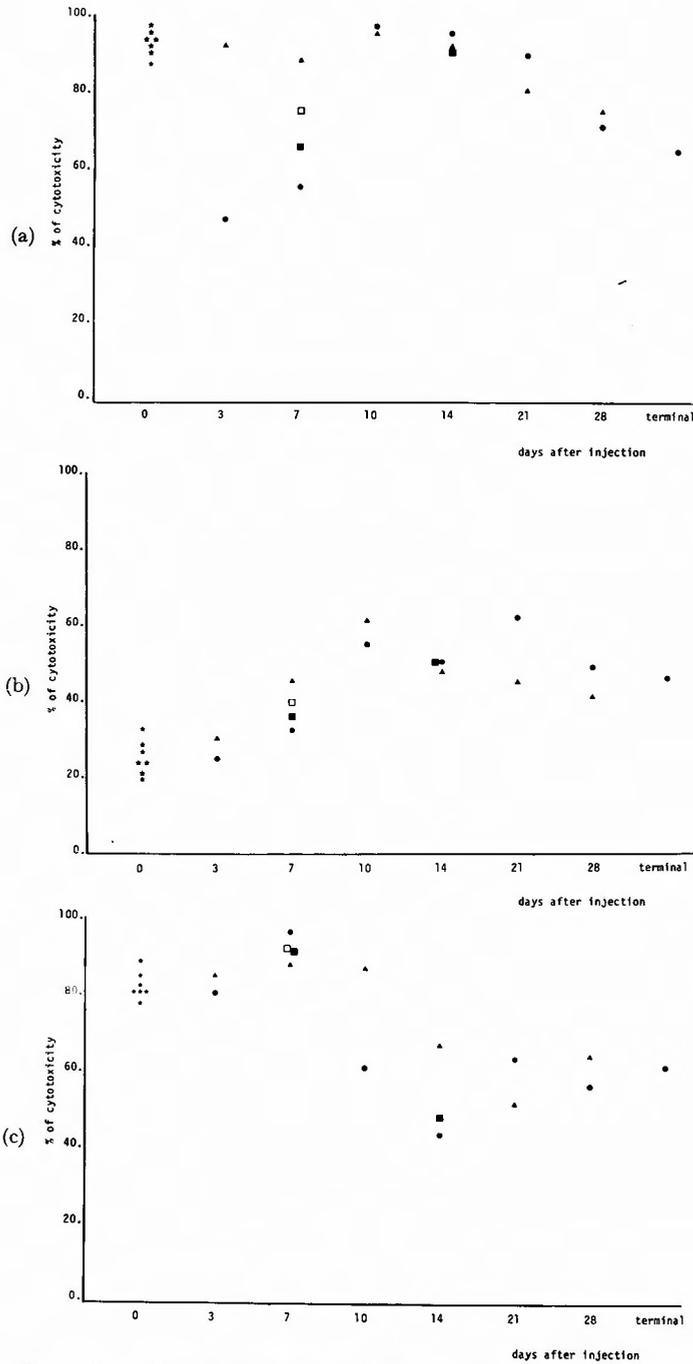


Fig. 6. Cytotoxic activity of spleen cells (a), thymic cells (b) and peripheral blood lymphocytes (c) from tumor bearing rat at day 7 and 14 after transcarsal tumor cell inoculation with (□) or without (■) ultrasonic brain damage. The results after subcutaneous (●) and direct intracerebral (▲) inoculation are also shown. (★) shown at day 0 represent mean values of cytotoxicities obtained from controlled rat at each of the experiments.

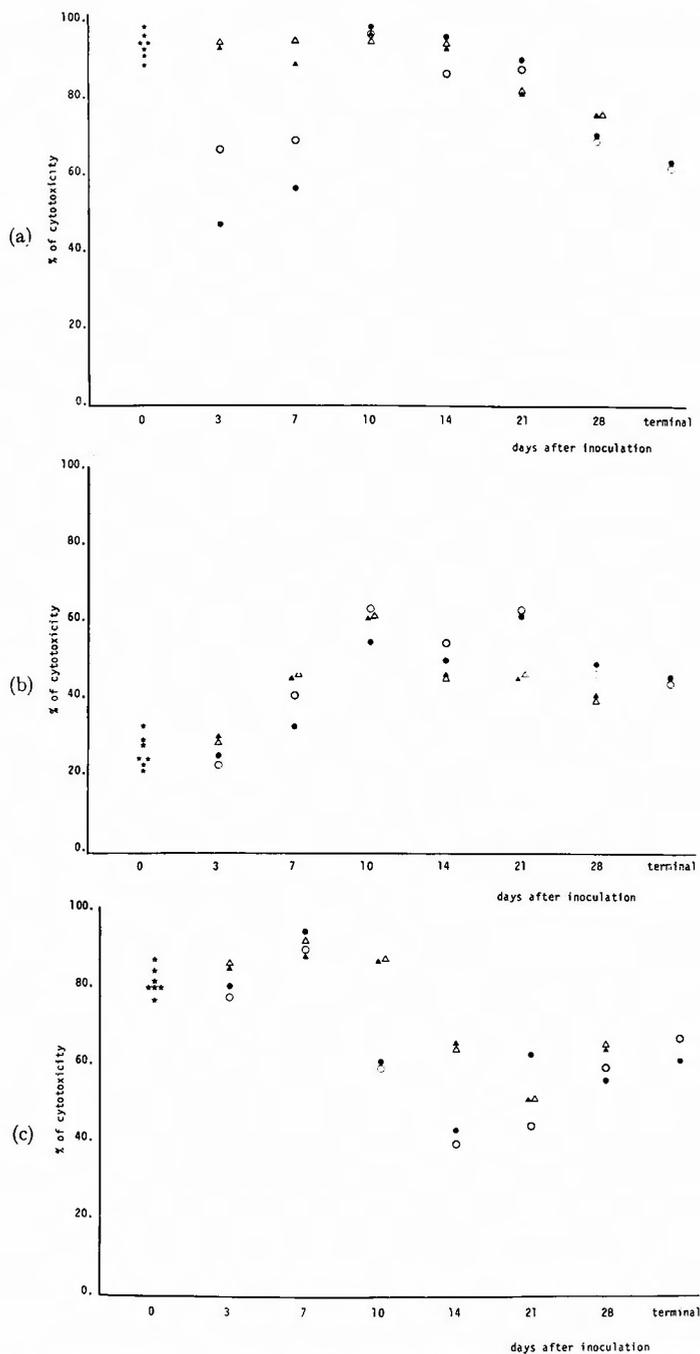


Fig. 7. Cytotoxic activity of spleen cells (a), thymic cells (b) and peripheral blood lymphocytes (c) from either early passaged (open symbol) or old passaged (black symbol) tumor bearing rat during the course of tumor development after subcutaneous (circle) and intracerebral (triangle) inoculation; (○): subcutaneous inoculation of the early passaged tumor, (△): intracerebral inoculation of the early passaged tumor, (●): subcutaneous inoculation of the old passaged tumor, (▲): intracerebral inoculation of the old passaged tumor. (★) shown at day 0 represent mean values of cytotoxicities obtained from controlled rat at each of the experiments.

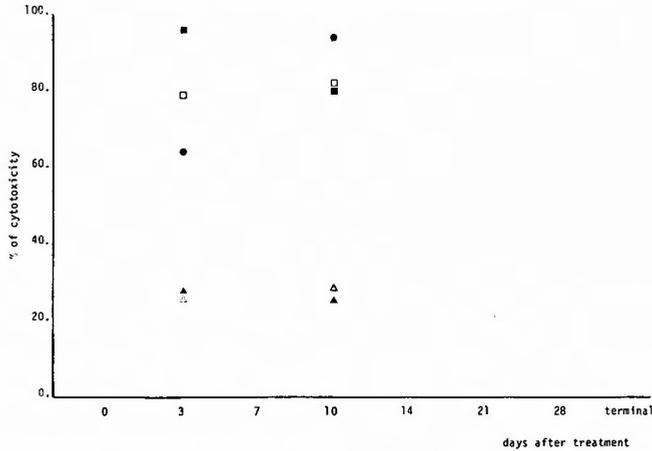


Fig. 8. Sham test. Cytotoxic activity of spleen cells (circle), thymic cells (triangle) and peripheral blood lymphocytes (square) after needle puncture with (open symbol) or without (black symbol) saline injection; (●): spleen cells, needle puncture only. (○): spleen cells, needle puncture with saline injection. (▲): thymic cells, needle puncture only. (△): thymic cells, needle puncture with saline injection. (■) peripheral blood lymphocytes, needle puncture only. (□): peripheral blood lymphocytes, needle puncture with saline injection.

early T₁の方が急激な障害性の低下を示した。脳内接種の場合は、やはり両者の間には差は認められなかった (Fig. 7b)。

末梢リンパ球では、皮下接種の場合、10日目までは、early T₁とold T₁の間に差はないが、2週目、3週目ではearly T₁がold T₁よりさらに障害性の低下をみ、更に末期の4週以降になるとold T₁を上回る高い障害性を示した。脳内接種の場合は、両者の間に差はなかった (Fig. 7c)。

実験6: Sham test. 脳内接種の場合、注射針による脳実質の機械的損傷、更に腫瘍細胞注入による脳実質の圧迫障害が、全身性免疫反応に及ぼす影響の有無を調べるため、針のみ穿刺の場合、針を穿刺後生理食塩水10μlを注入した場合について、操作後3日目と10日目に各リンパ球の細胞障害性について検討した。

脾臓リンパ球の場合に、3日目、10日目共、注射針の刺入のみによっても軽度の障害性の上昇をみた以外、操作の影響は認められなかった (Fig. 8)。

考 察

腫瘍と生体の免疫反応をみる場合、腫瘍の性質の違いはもちろんであるが、免疫反応の担い手であるリンパ球にも種々のsubpopulationがあり、これ等subpopulationの相互作用で、細胞性免疫反応が複雑な様相

を呈していると考えられる。

近年になり、従来のように腫瘍細胞に対して特異的にその増殖を阻止する因子—killer T cell (Tc)—の他に、感作による特異的な反応でなく、非特異的に腫瘍の増殖を阻止する因子—natural killer cell (NK)—が注目をあつめるようになった^{13,14)}。このような腫瘍細胞に対するpositiveな働きその他、これ等の作用を抑制する因子—suppressor T cell (Ts)—の研究も進められている。

著者等は、ethylnitrosoureaで誘発した脳腫瘍の性質を検討した際、in vivo, active protection testでimmunological enhancementの現象に遭遇した。この現象の解析に、in vitroで臓器別にリンパ球の細胞障害性を調べた結果、各リンパ球がそれぞれ特徴的なパターンを示した。

まず、脾臓リンパ球、及び末梢血リンパ球には強いNK activityのみられる事が分った。脾臓リンパ球で90%以上、末梢血リンパ球で85%以上の障害性がみられた。

このNK cellに関しては、Tai A.等(1980)³³⁾はマウスの年齢によってNK activityに差がみられると報告している。一方Broock CG.等(1980)⁴⁾によれば、5週令から22ヶ月のラットの間には差はみられなかった。今回の実験では、6週から14週の間では差はみら

れなかったが、これ等の報告に比べ一貫して高い activity がみられた^{10, 41)}。

このように高い NK activity が、感作状態の脾臓リンパ球で低下する事は、腫瘍の免疫治療を考える場合には都合の悪いことである。一方胸腺リンパ球やリンパ節リンパ球では、NK activity はあまりみられないが、感作により著明な障害性の上昇がみられた事より、胸腺やリンパ節のリンパ球には killer T cell が多量に含まれていると考えられる。NK activity の高い末梢リンパ球でも、感作により軽度の障害性の上昇をみた。この事は、腫瘍の免疫治療を考える場合には都合の良い事である。

では、何故に脾臓リンパ球では障害性が低下してしまうのであろうか。脾臓リンパ球の中の NK cell が相対的に減少してしまうとも考えられるが⁴⁰⁾、それでは TL 比を100から200に上げた時障害性は上昇しなければならぬ。

Zoller M. 等(1980)⁴¹⁾は、NK cell は suppressor cell の影響を受けることを示唆している。すなわち、NK activity は非特異的に働くのであるが、suppressor cell を介してその activity は抑制されると考えられる。更に Herberman RB. 等(1978)⁴²⁾によれば、prethymic T cell (T₁, T₂) が suppressor T cell の影響を受けるといふ。この prethymic T cell は NK cell と同じものであると考えられる。

以上、suppressor cell が、単に抗原に特異的な killer T cell への分化過程の抑制のみでなく²⁷⁾、非特異的な NK activity にも影響を及ぼしていると考え、脾臓リンパ球の動態は理解できる。すなわち、脾臓リンパ球には NK activity を有するリンパ球と suppressive activity を有するリンパ球が豊富に含まれ、胸腺リンパ球及びリンパ節リンパ球には killer T cell が多く含まれ、末梢血リンパ球は大部分が NK cell で killer T cell も含まれていると理解できる。

本実験系では、このように個々のリンパ球の subpopulation の activity が分離して表現されるので、免疫反応相互作用の解析には都合が良い。

では、担癌状態になると脾臓リンパ球では再び障害性が増加するのは何故であろうか。この解釈には、Schechter B. 等(1979)²⁸⁾のいう memory T cell (T_m) の概念が必要になる。すなわち、抗原刺激を受けた memory cell が、killer T cell や suppressor T cell を activate するが、抗原が更に多量に存在すると memory cell 自体が neutralize されてしまう。

実験2で分るように、抗原によって刺激された memory cell によって killer T cell より suppressor T cell が先に、より強く activate される。やがて suppressor T cell, killer T cell 共刺激されるようになる。腫瘍接種後10日目頃になり腫瘍の増殖がすすみ抗原が増加してくると、memory cell は neutralize されてしまう。suppressor T cell の life span は killer T cell の life span より短かいと考えられるので¹⁷⁾、この状態になると active な suppressor T cell は消滅してしまい、suppressor T cell の NK activity や killer T cell に対する抑制作用はみられなくなる。やがて killer T cell も activate されなくなり、担癌末期になると総ての免疫リンパ球は出現しなくなる。

一方、Riccardi G. 等(1980)²⁶⁾によると、NK cell の activity の低下は suppressor T cell と同様早いと報告している。本実験系では、末梢血リンパ球で、接種後7日目、10日目でも強い障害性を維持していた。末梢血リンパ球には NK cell のみでなく killer T cell も含まれているので、この強い障害性は killer T cell によるものかも知れないが、NK activity もかなり残っているものと思われる。確証を得るためには、リンパ球の subpopulation を分離する方法が確立されなければならぬ。著者は、NK cell は prethymic T cell と同じものであると考えている^{15, 16)}。従って memory cell の影響を受けない NK cell は最後まで残っても良いと考えられる。担癌末期に NK activity が低下する mechanism については不明である。

以上、リンパ球の subpopulation の相互関係を Fig. 9 に示した。

Kamat R. 等(1975)¹⁹⁾は、prethymic cell の他に pre-killer T cell という考えを示している。また、Hochman PS. 等(1979)¹⁷⁾は、pre-suppressor T cell という subpopulation を考えているが、Fig. 9 ではそれぞれ T_c, T_s と表現した。これは mature T cell であるが、実際に killer, suppressor と確認されるのは、memory cell を介して抗原刺激を受けた active T_c, active T_s であり、このような activity を持たないリンパ球は pre type と考えられる。さらに、prethymic cell がいくつかの成熟過程を経て mature type となり、環境、条件等の相違によって、active killer T cell にも active suppressor T cell にも変化し得る、すなわち pre-killer T cell と pre-suppressor T cell は同一の subpopulation ではないかとも考えられるが、推測の域はでない。

少なくとも、killer cell, suppressor cell というより

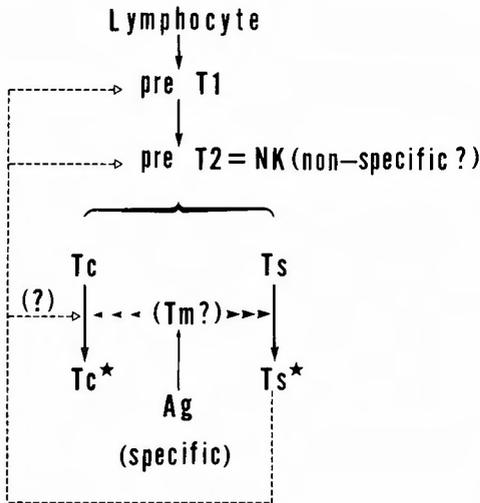


Fig. 9. Hypothesis of correlation between subpopulations of the lymphocytes, natural killer cells (NK), cytotoxic or killer T cells (Tc) and suppressor T cells (Ts). Lymphocytes will mature to cytotoxic T cells and suppressor T cells via pre-thymic cell types (pre-T1, and pre-T2). Then mature Tc and Ts will be immunized to active TC (TC*) and active Ts (Ts*) by the specific antigens (Ag) via memory T cells (Tm), and this active Ts will suppress not only the pathway in which Tc mature to active Tc but also pre-mature cells, pre-T1 or pre-T2, which may be identical with natural killer cells.

は, killer activity, suppressive activity と表現するべきであると思われるが本文中用いた NK cell, killer T cell, suppressor T cell という表現は, あくまで activity という意味であり, 一部は文献上の表現に従い使い分けた。

ラットリンパ球の subpopulation の分離は, Kierszenbaum F. 等 (1978)²⁰⁾ によって試みられているが, マウスやヒトの場合と違いまだ確立されていない。従って, マウスの研究結果をラットにあてはめるのは問題があるが^{5, 6)}, 現象としては緊密な類似性が認められている。

Watson S. 等 (1980)³⁹⁾ は, 免疫能力が弱いと suppressor cell が誘発され易いと報告している。本実験でも, 抗原性の強い若い世代の腫瘍を用いると, 抗原性の弱い古い世代の腫瘍を用いた時にみられた脾臓リンパ球の早期の障害性の低下は軽減し, 一方胸腺リンパ球の障害性は高くなった。末梢血リンパ球では抗原性

の差はあまり影響がなかった。

すなわち, 抗原性が強いと suppressive activity は誘発されにくく, killer activity はより強く誘発された。この事は, 腫瘍の免疫治療を考える場合には重要な点であると思われる。

脳内に接種した場合は, 皮下接種の場合に比べ, 組織学的に明らかにリンパ網内系細胞の反応は違っていた。特に腫瘍の脳内への浸潤は, Virchow Robin space や nerve fiber に沿ってみられるが, その周囲には全くリンパ網内系細胞の反応はみられなかった³⁸⁾。従って, 脳内接種後のリンパ球の細胞障害性を検討することは, 抗原性の差の問題同様に意味のある事と思われる¹⁸⁾。

脳内に直接接種した場合の脾臓リンパ球では, 早期の障害性の低下はみられないのに対して, 胸腺リンパ球ではむしろ抗原性の強い腫瘍の場合に類似した障害性を示す傾向がみられた。すなわち, 脳内に接種した場合, killer activity はみられるが, suppressive activity は誘発されないと考えられる。また胸腺リンパ球では, 末期にみられた細胞障害性の低下がより早期にみられた。末梢リンパ球では, 皮下接種に比べ高い障害性が維持された。

以上より考えると, 脳内に接種した場合, 抗原性は強く認識され, また抗原量も多くなるのかも知れない。従って suppressive activity の誘発はなく, killer activity が強く誘発される。一方抗原量も多いため, memory cell の neutralization も早くみられるのではないかも考えられるが, しかしながら, 抗原性の違う腫瘍の間では, 細胞障害性に全く差がみられなかった。

ただ, 結果のところでも述べたように, 現段階では, 脳実質の損傷なしに腫瘍を作成することが不可能なために断言はできないが, 脳内に浸潤するリンパ球は全身性のものとは, 免疫学的な意味から違う事が予想される^{11, 29, 30, 31)}。

経頸動脈接種では, 脳内接種と皮下接種の中間的な障害性を示したのは, 腫瘍が眼窩内, 錐体骨部, 脳室内等に多発しているためで, これ等の中に, 皮下組織に比べ脳実質に近いリンパ網内系細胞反応を示す部分があるのかも知れない。

さらに, 少数例ながら超音波脳破壊後, 頸動脈より注入した場合には, さらに脳内接種に近い傾向をみたことは興味ある結果であったが, いずれも現段階では確定し得ない。

以上, 脳内に腫瘍が存在する場合には, suppressive activity は誘発されにくい。従って, 脳内腫瘍は非常

に強い killer activity を受けるはずであるが、一方リンパ系組織はないと考えられている“脳”という特徴から、killer activity を有したリンパ球が、脳内の腫瘍細胞に接する機会は皮下の場合より少ないと考えられる。実際、リンパ網内系細胞浸潤と脳腫瘍の予後との相関関係を指摘している報告も多い^{18, 21, 32, 35}。

今後、脳実質内に腫瘍を生着させる方法を改良すると共に、ラットリンパ球の subpopulation の分離法を確立し、本実験のリンパ球の動態に確証を得る必要がある。一方、low dose irradiation, cyclophosphamide, hydrocortisone¹⁷⁾, insoluble histaminebinding rabbit serum albumine 等¹⁶⁾を用いて、個々の subpopulation を個別に除外し検討し得る可能性もある。

全体を通して強調されることは、生体にはもともとNK activity をもったリンパ球が豊富にあり、一般の状態では、その腫瘍に抗原性があるにかかわらず腫瘍は生長できない。しかし、抗原性が弱いとむしろ suppressive activity の方がより強く誘発されてしまい、これが killer activity のみでなくNK activity までも低下させるように働く可能性がある。Custer RP. 等(1973)⁷⁾が報告したように、nude mouse における“lack of immunostimulation”は結果として自然発生腫瘍を少なくしている。

このように考えると、腫瘍が生着するためには、むしろ特異的な細胞性免疫反応が必要と考えるのが妥当のように思われる。

従って、腫瘍の免疫治療を考える場合にも、この点を考慮しなければ、治療を施すことが逆に腫瘍の増殖を促進している結果にもなりかねない。

結 語

脳腫瘍を皮下に接種後経時的に、脾臓、胸腺、リンパ節、及び末梢血の各リンパ球の細胞障害性について、direct microcytotoxicity test を用いて検討した。

脾臓リンパ球には natural killer (NK) activity が強く認められるが、抗原刺激を受けると、早期に suppressive activity が誘発され、NK activity は著明に抑制された。腫瘍抗原の増加に伴い suppressive activity の neutralization がみられ、一時的に細胞障害性は回復するが、担瘤末期になるとNK activity も低下した。胸腺、及びリンパ節リンパ球では、NK activity は非常に少ないが、抗原刺激により、suppressive activity より少し遅れて killer activity が誘発された。killer activity の life span は suppressive activity のそれより

かなり長い、担瘤末期になるとやはり軽度の細胞障害性の低下がみられた。末梢血リンパ球では、NK activity が強くみられ、killer activity も含まれていた。

抗原性を高めると、suppressive activity の誘発は減少し、killer activity はより強く誘発された。

脳内に接種された場合には、抗原性の強弱には関係なく、suppressive activity は誘発されず、killer activity のみが強く誘発された。これは、脳内におけるリンパ網内系細胞反応が、皮下の場合とは異なる事を意味していると思われる。

リンパ球の subpopulation の相互関係は後述の如くである。

生体には本来NK activity が豊富に含まれ、腫瘍の抗原刺激を受けると免疫細胞が働くが、この際 memory cell を介して行なわれると考えられる。抗原刺激が非常に強い場合は、NK activity に免疫細胞による killer activity が加わり、強い障害性が得られるが、弱い場合は、むしろ suppressive activity が、しかも killer activity より早く誘発される。この suppressive activity は免疫細胞の killer activity のみでなくNK activity の活動をも抑制してしまう。このNK activity を有しているのは pre thymic な細胞と考えられる。

従って、腫瘍の免疫治療を考える場合、この suppressive activity の処理を考慮しないと、腫瘍の増殖を促進していることになりかねない。

稿を終るにあたり、懇篤な御指導と御校閲を賜った本学脳神経外科教室、半田 肇教授に深甚なる感謝の意を捧げます。また、3年半の長きにわたり、免疫理論、実験の方法論、及びデータの解釈に御教授、御指導いただいた高知医科大学脳神経外科、織田祥史助教授に感謝いたします。また、山下純宏講師、武内重二講師はじめ、各教室の諸先生方、データ処理に御協力いただいた京都大学工学部学生、神原輝寿君、長期のラット飼育に関し、京都大学医学部動物実施、山田淳三助教授はじめスタッフ一同に御協力いただいたことを感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Attia MAM, Weiss DW: Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice. *Cancer Res* **26**: 1787-1800, 1966.
- 2) Baldwin RW, Braker CR: Demonstration of tumor specific humoral antibody against aminoazo dye-induced rat hepatoma. *Brit J Cancer* **21**: 793-800, 1967.
- 3) Böyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* **21** (supple 97): 77-89, 1968.

- 4) Brooks CG, Flannery GR: Quantitative studies of natural immunity to solid tumor in rats. Persistence of natural immunity throughout reproductive life, and adherence of suppressor cells in infant rats. *Immunology* **39**: 187-194, 1980.
- 5) Conley FK: Influence of chronic toxoplasma infection on ethylnitrosourea-induced central nervous system tumors in rat. *Cancer Res* **40**: 1240-1244, 1980.
- 6) Cornain S, Carnaud C, et al: Spleen cell reactivity against transplanted neurogenic rat tumors induced by ethylnitrosourea: Uncovering of tumor specificity after removal of complement-receptor-bearing lymphocytes. *Int J Cancer* **16**: 301-311, 1975.
- 7) Custer RP, Outzen HC, et al: Does the absence of immunologic surveillance affect the tumor incidence in "nude" mice? First recorded spontaneous lymphoma in a "nude" mouse. *JNCI* **51**: 707-709, 1973.
- 8) Di Lorenzo N, Palma L, et al: Lymphocytic infiltration in long-survival glioblastomas: Possible host's resistance. *Acta Neurochir* **39**: 27-33, 1977.
- 9) de Vries JE, Meyering M, et al: The influence of different isolation procedures and the use of target cells from melanoma cell lines and short-term cultures on the non-specific cytotoxic effects of lymphocytes from healthy donors. *Int J Cancer* **15**: 391-404, 1975.
- 10) Fields KL: New cell surface antigens in rat defined by tumors of the nervous system. *Proc Nat Acad Sci* **72**: 1296-1300, 1975.
- 11) Hašek M, Chutna J, et al: Immunological tolerance and tumor allografts in the brain. *Nature* **268**: 68-69, 1977.
- 12) Heppner G, Henry E, et al: Problems in the clinical use of the microcytotoxicity assay for measuring cell-mediated immunity to tumor cells. *Cancer Res* **35**: 1931-1937, 1975.
- 13) Herberman RB, Nunn ME, et al: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* **16**: 216-219, 1975.
- 14) Herberman RB, Nunn ME, et al: Augmentation of natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic target cells. *Int J Cancer* **19**: 55-564, 1977.
- 15) Herberman RB, Nunn ME, et al: Low density of Thy 1 antigen on mouse effector cells mediating natural cytotoxicity against tumor cells. *J Immunology* **121**(1): 304-309, 1978.
- 16) Herberman RB, Holden HT, et al: Cytotoxicity against tumors by NK and K cells; Spreafico F. & Arnon R. "Tumor-associated antigens and their specific immune response"-Proceedings of the Sereno Symposia, vol. 16 pp 129-150, Academic Press, London, 1979.
- 17) Hochman PS, Cudkowicz G: Suppression of natural cytotoxicity by spleen cells of hydrocortisone treated mice. *J Immunology* **123**(3): 968-976, 1979.
- 18) 井上啓一, 祖父江八紀, 他: 脳腫瘍動物モデルにおける免疫監視機構-micro-test plate法によるリンパ球の殺腫瘍細胞性の経時的変化の検索. *脳神経* **30**(11): 1215-1219, 1978.
- 19) Kamat P, Henney CS: Studies on T cell clonal expansion. I. Suppression of killer T cell production in vivo. *J Immunology* **115**(6): 1592-1598, 1975.
- 20) Kierszenbaum F, Budzko DB: Identification and characterization of a new subset of rat T lymphocytes. *J Immunology* **121**(1): 166-171, 1978.
- 21) Morantz RA, Wood GW, et al: Macrophages in experimental and human brain tumors: Part 2: Studies of the macrophage content of human brain tumors. *J Neurosurg* **50**: 305-311, 1979.
- 22) Oda Y, Handa H, et al: Induction and transplantability of rat neurogenic tumors. *Arch Jpn Chir* **46**(5): 513-520, 1977.
- 23) Oda Y, Handa H, et al: Antigenic cross-reactivities of rat neurogenic tumors induced by ethylnitrosourea tested by capillary migration inhibition test. *Arch Jpn Chir* **46**(5): 521-529, 1977.
- 24) Oda Y, Handa H, et al: Cross-reactivity of ethylnitrosourea-induced neurogenic rat tumors studied by in vitro assay for cell mediated immunity. *Europ J Cancer* **14**: 491-499, 1978.
- 25) Pierce GE, DeVald BL: Microcytotoxicity assays of tumor immunity in patients with bronchogenic carcinoma correlated with clinical status. *Cancer Res* **35**: 3577-3584, 1975.
- 26) Riccardi C, Santoni A, et al: In vivo natural reactivity of mice against tumor cells. *Int J Cancer* **25**: 475-486, 1980.
- 27) Rollinghoff M, Starzinski-Powitz A, et al: Cyclophosphamide-sensitive T lymphocytes suppress the in vivo generation of antigen specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **145**: 455-459, 1977.
- 28) Schechter B, Feldman M: Cytotoxic and suppressor lymphocytes in tumor development; Spreafico F. & Arnon R. "Tumor-associated antigens and their specific immune response." -Proceedings of the Serno Symposia, vol. 16 pp 237-250, Academic Press, London, 1979.
- 29) Scheinberg LC, Suzuki K, et al: Studies in immunization against a transplantable cerebral

- mouse glioma. *J Neurosurg* **20**: 312-316, 1963.
- 30) Scheinberg LC, Edelman FA, et al: Is the brain "an immunologically privileged site?" I. Studies based on intracerebral tumor homotransplantation and isograft transplantation to sensitized hosts. *Arch Neurol* **11**: 248-264, 1964.
- 31) Scheinberg LC, Levy WA, et al: Is the brain an "immunologically privileged site?" II. Studies in induced host resistance to transplantable mouse glioma following irradiation of prior implants. *Arch Neurol* **13**: 283-286, 1965.
- 32) Schiffer D, Croveri G, et al: Frequenza e significato degli infiltrati linfo-plasmacellulari nei gliomi umani.; *Tumori* **60**: 177-184, 1974.
- 33) Tai A, Burton RC, et al: Differential natural killer cell reactivity against T cell lymphoma by cells from normal or stimulated mice. *J Immunology* **124**(4): 1705-1711, 1980.
- 34) Takasugi M, Klein E: A micro-assay for cell-mediated immunity. *Transplantation* **9**: 219-227, 1970
- 35) Takeuchi J, Barnard RO: Perivascular lymphocytic cuffing in astrocytomas. *Acta Neuropathol* **35**: 265-271, 1976.
- 36) 徳力康彦, 織田祥史, 他: ENU 誘発脳腫瘍における immunological enhancement: In vivo, active protection test 及び tumor neutralization test. *日外宝* **48**: 551-553, 1979.
- 37) 徳力康彦, 織田祥史, 他: ENU 誘発ラット脳腫瘍における細胞障害試験. *日外宝* **48**: 733-735, 1979.
- 38) 徳力康彦, 武内重二, 他: Picibanil 脳内局所投与の及ぼす効果—組織学的変化について. 脳外投稿中
- 39) Watson S, Collins FM: Development of suppressor T cells in mice heavily infected with mycobacteria. *Immunology* **39**: 367-373, 1980.
- 40) Wepsic HT, Harris S, et al: Enhancement of tumor growth following immunization with *Bacillus Calmette Guérin* cell walls. *Cancer Res* **36**: 1950-1953, 1976.
- 41) Zoller M, Matzuk S: Characterization of natural cytotoxicity in vitro in a spontaneous rat tumor model. *J Immunology* **124**(4): 1683-1690, 1980.