

マウス移植腫瘍モデルにおける抗腫瘍免疫 エフェクターT細胞機構の解析

京都大学医学部脳神経外科学教室（指導：半田肇教授）

樺

篤

〔原稿受付：昭和60年8月6日〕

Analysis of Effector T Lymphocyte Subpopulations Necessary to Mediate Semisynthetic Tumor Rejection in Mice

ATSUSHI KEYAKI

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. HAJIME HANDA)

The effector T lymphocyte subpopulations necessary to mediate semisynthetic tumor rejection was investigated in mice using two different tumors transplanted subcutaneously or intracranially.

(BALB/c×C57BL/6)F₁-nu/+ mice were immunized with either a radiation-induced leukemia RL♂1 of BALB/c origin or Friend virus-induced lymphoma FBL-3 of C57BL/6 origin by subcutaneous injection of viable tumor cells followed by spontaneous regression of the tumor mass. The spleen cells harvested from these immunized mice were treated with either monoclonal anti Thy-1 or anti Lyt antibody and complement in order to eliminate desired T lymphocyte subpopulations, and then used as effector cells in both Winn-type neutralization assay and systemic transfer study using CB6F₁-nu/nu mice as recipients. According to these in vivo studies, Lyt-1+23⁻ cells in FBL-3 system, and Lyt-23⁺ cells (i.e. Lyt-1-23⁺ and Lyt-1+23⁺) in RL♂1 system were considered to play a major role in tumor rejection. However, an increased number of Lyt-1-23⁺ immune spleen cells were also capable to reject FBL-3 tumors.

The distinctive footpad reaction, histologically confirmed as delayed-type hypersensitivity (DTH) was observed in FBL-3 system, whereas any footpad swelling was not seen in RL♂1 system when tumor-immune CB6F₁-nu/+ mice were challenged with irradiated tumor cells into footpad. The effector T lymphocyte subpopulations to mediate DTH against FBL-3 were also studied when the FBL-3-immune spleen cells treated with anti Lyt antibodies plus complement

Key words: Tumor immunology, T lymphocyte subpopulation, Cytotoxic T lymphocyte, Delayed-type hypersensitivity, Immunotherapy.

索引語：腫瘍免疫，Tリンパ球サブセット，細胞障害性T細胞，遅延型過敏症反応，免疫療法。

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

were injected together with irradiated FBL-3 into footpad of CB6F₁-nu/nu mice. Consequently, Lyt-1+23⁻ subpopulation, which were the same surface phenotype of lymphocyte to mediate tumor rejection in FBL-3 system, was considered to mediate DTH reaction. These results suggest the close relationship between tumor rejection and DTH response in FBL-3 system.

The effect of both cytotoxic and noncytotoxic T cell lines on established FBL-3 tumors was also studied in both neutralization and systemic transfer studies. Cytotoxic cell line against FBL-3, CTLL-E2, which was obtained by limiting dilution of the FBL-3-immune spleen cells in the presence of IL-2 but maintained without an addition of it, was composed of three lymphocyte subpopulations such as 10–15% Lyt-1+23⁻, 55–70% Lyt-1+23⁺ and 20–30% Lyt-1-23⁺ cells, revealed highly specific antitumor activity in vivo. However, noncytotoxic cell line E2n, which composed of entirely Lyt-1+23⁻ cells, had no antitumor activity against established FBL-3. The capacity of both cell lines to induce the reaction of DTH was also studied. The result that both cell lines failed to induce DTH against irradiated FBL-3 cells suggests the functional disparity of Lyt-1+23⁻ cells between cultured cell lines and immune spleen cells.

In conclusion, it was clarified that the heterogeneous T lymphocyte subpopulations were induced according to the tumor system used, indicating the importance of not only Lyt-2⁺ CTL but also Lyt-1+23⁻ subpopulation in semisynthetic tumor rejection.

要 旨

異なる2つのマウス腫瘍を用いた皮下及び頭蓋内移植モデルにおいて抗腫瘍免疫エフェクターT細胞機構の解析を行った。

BALB/c マウス (H-2d) の放射線照射誘発白血病細胞 RL σ 1, 又は C57BL/6 マウスから Friend virus により誘発された lymphoma FBL-3 の両腫瘍細胞で (BALB/c $\times$ C57BL/6)F₁(CB6F₁) マウスを免疫した。免疫脾細胞を抗マウスリンパ球抗体(抗 Thy-1, 抗 Lyt)と補体の処理により特定のリンパ球サブセットに分別した後、局所中和試験及び全身移入試験を行いそれぞれのサブセットの腫瘍拒絶能を検討した。その結果、両腫瘍系とも腫瘍拒絶を誘導するためにはT細胞の存在が必須であり RL σ 1 の系においては Lyt-1+23⁺及び Lyt-1+23⁻細胞が、FBL-3 の系では Lyt-1+23⁻ 及び Lyt-1-23⁺細胞が in vivo において主要なエフェクター細胞として働いていることが明らかにされた。また、頭蓋内移植腫瘍モデルと皮下移植腫瘍モデルの間にはエフェクターサブセットに異同はみられなかった。

従来より Lyt-1+23⁻細胞が遅延型過敏症(DTH)反応のエフェクター細胞と考えられていることにより、両腫瘍細胞でそれぞれ免疫された CB6F₁-nu/+ マウ

ス及び免疫脾細胞の移入後腫瘍を拒絶したヌードマウスに対し、放射線照射した腫瘍細胞を足趾部に接種しその腫脹を計測することにより DTH 反応性の有無を検討したところ、FBL-3 の系では強い足趾部腫脹が観察され、同反応が免疫脾細胞中の Lyt-1+23⁻ T細胞により惹起されていることが明らかとなったが、RL σ 1 の系ではその様な腫脹は認められなかった。FBL-3 を用いた系において、同じ表面抗原(Lyt-1+23⁻)を有する脾細胞が腫瘍拒絶と DTH 反応を惹起することより両者の関連が示唆された。

一方、FBL-3 腫瘍の拒絶における Lyt-23⁺CTL サブセットの関与を調べるため、FBL-3 で免疫した脾細胞よりリンパ球腫瘍混合培養法を利用した限界希釈法によりT細胞増殖因子(IL-2)の添加なしで増殖し続け、かつ FBL-3 に対して強い細胞障害性を有するT細胞混合株 CTLL-E2 を確立し in vivo での効果を検討したところ、腫瘍中和試験並びに全身移入試験で強い抗腫瘍能を示した。一方、Lyt-1+23⁻細胞単独で構成されている非細胞障害性T細胞株 E2n は FBL-3 に対して腫瘍拒絶能を示さず、また DTH 反応も惹起できなかった。以上の結果は FBL-3 の系においては従来より腫瘍拒絶の中心的なエフェクター細胞と考えられてきた CTL 以外に DTH 反応を惹起すると同一のサブセットである Lyt-1+23⁻細胞が in vivo でのエ

フェクター細胞として重要であることを示している。また、誘導されるエフェクターサブセットの多様性は腫瘍細胞の保持する抗原性に依存していることが示唆された。

結 言

同種移植拒絶反応やある種の同系腫瘍の拒絶反応においては、個体の細胞性免疫機構が中心的な役割を果たしており、このような免疫反応ではT細胞が必須のエフェクター細胞であることが近年の研究により明らかにされてきた^{7,27,32,37,68}。Cantor と Boyse^{4,5} はリンパ球の分化抗原の一種である L_{yt} 抗原系に着目し、T細胞には L_{yt} の表現型に対応した亜集団(サブセット)が存在しそのようなT細胞サブセットはそれぞれに固有の機能を発現していることを明らかにし、以後のT細胞機能の解析に重要な契機を与えた^{38,59,67,79,80}。このような L_{yt} 表現型によるT細胞の分類によれば L_{yt}-23⁻(L_{yt}-1⁺23⁺, L_{yt}-1⁻23⁺) T細胞サブセットは *in vitro* において強い細胞障害性を示すが故に⁵⁹、細胞障害性Tリンパ球(Cytotoxic T Lymphocyte, CTL)と呼ばれ、*in vivo* においても同種移植片及び腫瘍拒絶反応を直接に担う細胞であろうと考えられてきた^{7,50,57,81}。しかし、リンパ球(腫瘍)混合培養(ML(T)C)細胞やT細胞増殖因子(IL-2)依存性T細胞クローンを使用した従来の方法論には種々の問題があり、これを直接的に証明することは困難であったが、私達はIL-2の添加なしで増殖しかつ腫瘍特異的なCTL株を樹立することにより、CTLが*in vivo* においても同系腫瘍拒絶の中心的なエフェクター細胞であることを報告してきた^{41,45}。私達の確立した系で用いた腫瘍は本研究においても一部使用した放射線誘発白血病細胞RL♂1であり、この腫瘍は免疫個体にCTLは誘導するがCTLとそのL_{yt}表現型の異なるL_{yt}-1⁺23⁻T細胞サブセットにより惹起される遅延型過敏症(delayed-type hypersensitivity, DTH)反応は証明されず、又L_{yt}-1⁺23⁻T細胞サブセットによってRL♂1腫瘍は排除されなかった⁴²。

一方、近年virusにより誘発されたlymphomaを用いた実験系においてDTH反応のエフェクターと同一のL_{yt}表現型を有するL_{yt}-1⁺23⁻T細胞サブセットにより同系腫瘍の拒絶が惹起されるとの報告が相次いでなされた^{24,33}。これらの報告では用いられた腫瘍が免疫個体にDTH反応を誘導するか否かについては検討されていないが、私達は既にFBL-3 lympho-

maが免疫個体に強いDTH反応を惹起することを報告してきた⁴²。

本研究においては、従来の諸報告が示唆する如く^{50,73}、使用する腫瘍に対応して免疫個体に誘導されるT細胞エフェクターのL_{yt}表現型に関する多様性が発現するか否かについて検討を加えた。その結果L_{yt}-23⁺のCTLは両系において腫瘍排除のエフェクターとして機能していることが確認されたが、DTH反応を強く惹起するFBL-3を用いた系においてはL_{yt}-1⁺23⁻T細胞サブセットも腫瘍排除に関与していることが明らかとなった。

研究材料および方法

1. 実験動物および腫瘍細胞

京都大学動物実験施設にて飼育管理された8-12週令のBALB/c(H-2d), C57BL/6(H-2b), (BALB/c×C57BL/6)F₁(CB6F₁)(H-2d/b)及びCB6F₁-nu/nu, (BALB/c×B10. Thy-1.1)F₁(CB10(Thy-1.1)F₁)(H-2d/b, Thy-1.2/Thy-1.1)マウスを用いた。実験腫瘍はBALB/cマウスから放射線照射により誘発された白血病細胞RL♂1, RL♂6, RL♀8, RL♀9, C57BL/6マウス由来のFriend virus誘発リンパ腫であるFBL-3細胞を用いた。一部の実験では化学剤により誘発された白血病細胞EL-4(C57BL/6), P815(DBA/2, H-2d), Moloney白血病virusで誘発されたNatural Killer(NK)細胞感受性のリンパ腫, YAC-1(A/Sn, H-2a)を用いた。RL♂1, RL♂6, RL♀8, RL♀9, EL-4とP815細胞は同系マウスの腹水型で、FBL-3とYAC-1細胞は10%の非凝固牛胎児血清(Fetal calf serum, FCS, Flow Laboratories, Inc., Rockville, MD)を添加された培養液RPMI-1640(Grand Island Biological Co., Grand Island, NY)の培地にて継代維持した。

2. 担腫瘍モデルの作製

腹腔内あるいは培養器より集めた腫瘍細胞はHanks balanced salt solution(HBSS)で3回洗浄後、皮下接種の場合には0.1 ml、脳内接種の場合には0.01 mlの量に浮遊させエーテル麻酔下に背部皮内、あるいはmicroinjector(Hamilton, 50 μl型)と27G矢追針を用い右大脳半球内に半定位的に移植した⁴³。CB6F₁ヌードマウスへの腫瘍生着率は皮内移植の場合FBL-3以外の腫瘍細胞では1×10⁵コ以上、FBL-3では1×10⁶コ以上の細胞数で100%であった。脳内移植の場合、いずれの腫瘍細胞でも1×10⁴コ以上の細胞数で100%

腫瘍が生着し3週間以内に全例腫瘍死した。

3. 腫瘍細胞によるマウスの免疫

5×10^5 コの RL σ 1 細胞を CB6F $_1$ マウスの背部皮内に移植した場合2—3週間の経過で10 mm 前後の腫瘍径に達した後4週以内に自然退縮し以後3—4回の生腫瘍細胞の漸増接種をも拒絶しその個体に特異的高免疫能を賦与することが知られている⁶⁰⁾。一方、 5×10^6 コの FBL-3 細胞を CB6F $_1$ マウスの背部皮内に移植すると2週目頃に10—15 mm の最大腫瘍径に達した後4週間以内に自然退縮する。RL σ 1 の系では5回目の免疫より2週後に、FBL-3 の系では初回免疫より5週後に脾臓を取り出し免疫脾細胞として用いた。

4. 脾細胞の培養及び CTL line の確立と維持

FBL-3 により免疫された CB6F $_1$ マウス脾より HBSS にて単細胞浮遊液を作成し、3回洗浄後 Complete medium (CM) に 5×10^5 /ml の濃度で浮遊させた。CM は RPMI-1640 に 10%FCS, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin と 100 μ g/ml streptomycin を加えたものを用いた。MLTC は 10,000 R 照射した腫瘍細胞 1×10^5 /ml と等量混合し総量 2 ml を 24穴平底プレート (Corning Glass Works, Corning, NY) にて5日間 37°C, 5%CO $_2$ 存在下で培養した。FBL-3 に対する CTL line の作成方法及びその維持は、RL σ 1 に対して同様の CTL line を得た方法に準じた^{45,49)}。すなわち FBL-3 で免疫された CB6F $_1$ マウスの脾細胞を responder として MLTC を行い5日目に ^{51}Cr 遊離試験で FBL-3 に対して高い細胞障害性を有することを確認した後、更に responder として 500 cells/well の密度で 5×10^3 — 1×10^4 /well の stimulator (10,000 R 照射した FBL-3), 1×10^6 /well の feeder cells (2000 R 照射した無処置 CB6F $_1$ マウスの脾細胞) と共に 5%(vol/vol) IL-2 含有 CM 内で 96穴平底プレートを用い10—14日間培養した。その間高い増殖活性を示し、かつ5時間 ^{51}Cr 遊離試験で FBL-3 に対して高い障害性を有する well より細胞を 5×10^4 コの stimulator と 5×10^6 コの feeder cell の存在下に IL-2 を添加せずに 24穴平底プレートに移した。7日目毎に新たに stimulator と feeder cell を添加することにより増殖した継代維持可能な6つの細胞株を得た。その中で最もよく増殖し、FBL-3 に対し特異的、かつ高い細胞障害性を有する細胞株 CTLL-E2 を選び以下の実験に用いた。又、CTLL-E2 を確立した2週間後に同細胞を抗 Lyt-2.2 抗体と補体で処理後 feeder

cell 単独にて培養することにより増殖する細胞株 E2n を得た。両細胞は約1週間で10—15倍の細胞数に増え、CTLL-E2 は新たに feeder cell と stimulator 添加後4—5日目に FBL-3 に対し最も高い細胞障害性を示した為、in vitro 及び in vivo の実験にはこの時点の細胞を用いた。

補体依存性細胞障害性試験及び間接蛍光抗体法で CTLL-E2 及び E2n 両細胞を構成しているリンパ球の表面マーカーを検索すると CTLL-E2 は Thy-1.2 $^{+}$ 100%, Lyt-1 $^{+}$ 23 $^{-}$ 10—15%, Lyt-1 $^{+}$ 23 $^{+}$ 20—30%, Lyt-1 $^{+}$ 23 $^{+}$ 55—70%であり、E2n は Thy-1.2 $^{+}$ 100%, Lyt-1 $^{+}$ 23 $^{-}$ 100%であった。

5. IL-2 の調整

SD ラットの脾細胞 (2.5×10^6 /ml) を 5 μ g/ml の concanavalin A (Con A) 存在下に 37°C, 5%CO $_2$ の incubator 内で24時間培養し遠心 (10,000 rpm, 20 min) の後培養上清を得た。0.45 μ m filter (Millipore Corp., Bedford, MA) を通した後 IL-2 source として使用した。

6. ^{51}Cr 遊離細胞障害性試験

標的となる腫瘍細胞 5×10^5 を 0.1 mCi Na $_2$ CrO $_4$ を含んだ 10%FCS 添加 RPMI-1640 培養液中で 37°C, 5%CO $_2$ の条件下で60分標識した。HBSS で3回洗浄後 10%FCS 添加 RPMI-1640 中に 1×10^5 /ml となるように浮遊させた。V底96穴プレートに一定の標的細胞 (1×10^4 /100 μ l) に対し希望する effector: target cell ratio (E/T) 比に調整した細胞数のエフェクター細胞 100 μ l を加え 3000 rpm で1分間遠心した後 37°C, 5%CO $_2$ の incubator 内に5時間静置した。その後 3000 rpm で5分間遠心し上清 100 μ l の放射能活性を gamma counter (Model 5236, Packard, Downers Grove, IL) にて測定した。 ^{51}Cr 遊離は次の算式により求めた。spontaneous release はすべての腫瘍細胞で15%以下であった。

$$\frac{\text{test cpm} - \text{spontaneous cpm}}{\text{total cpm} - \text{spontaneous cpm}} \times 100\%$$

7. 補体依存性細胞障害反応

特定のリンパ球集団を選別する為補体依存性細胞障害反応を行った。抗 Thy-1.1, 抗 Thy-1.2, 抗 Lyt-1.2, 抗 Lyt-2.2 (Meiji Institute of Health Science, Tokyo, Japan), 抗 asialo GM $_1$ (東海大学 垣生園子先生より供与) の各抗体と補体として非特異的細胞障害性の低い家兎血清を用いた。各モノクローナル抗体のマウス

胸腺細胞を標的細胞とした Maximum killing titer はそれぞれ $\times 1,000,000$, $\times 5,000$, $\times 5,000$, $\times 20,000$, $\times 1,000$ であり本実験には $\times 100$, $\times 100$, $\times 50$, $\times 50$, $\times 100$ に希釈して用いた。補体は予めマウス脾細胞に対して吸収した後使用時6-8倍に希釈した。まず目的とする細胞を HBSS にて3回洗浄後 $2 \times 10^7/\text{tube}$ の cell pellet としてその上に希釈した各モノクローナル抗体を $200 \mu\text{l}$ 加え攪拌後 4°C に45分間静置した(15分毎に攪拌)。その後、希釈した補体を 1 ml 加え、 37°C で40分間処理した。3回洗浄後 trypan blue dye exclusion method にて生細胞数を求めた。それぞれ、 $60.4 \pm 6.5\%$ (Thy-1.2 抗体処理), $50.3 \pm 8.4\%$ (Lyt-1.2 抗体処理), $53.8 \pm 6.9\%$ (Lyt-2.2 抗体処理)の生細胞が得られた。希望するT細胞サブセットが除去されたか否かを確認のため処理後の細胞 1×10^5 コを放射線照射($10,000 \text{ R}$)した腫瘍細胞 5×10^3 コと96穴U底プレートで5日間の MLTC を行い刺激した腫瘍細胞に対する細胞障害性を ^{51}Cr 遊離試験にて測定、あるいは処理後の細胞の Con A, PHA に対するマイトージェン反応を ^3H -thymidine の摂取率で測定し各抗体と補体での処理が完全であることを確認した。処理が不完全であると考えられる結果を得た場合、その細胞を使った実験は結果より除外した。

8. 腫瘍中和試験

Winn-type neutralization assay⁶⁹⁾ にて培養細胞株及び免疫脾細胞の腫瘍中和能を皮下及び頭蓋内において検討した。皮下においては 1×10^5 コの腫瘍細胞(FBL-3 の場合のみ 1×10^6 コ)とエフェクター細胞を $50 \mu\text{l}$ ずつ等量混合して移植した。頭蓋内においては 1×10^4 コの腫瘍細胞とエフェクター細胞を $5 \mu\text{l}$ ずつ等量混合し右大脳半球内に半定位的に移植した。皮下の場合は2-3日毎に腫瘍径を計測し長径と短径の平均を腫瘍径とし肉眼的に腫瘍の消失を以て腫瘍拒絶とみなした。皮下移植腫瘍消失後、他部位への転移等で死亡することはなかった。頭蓋内の場合、移植後60日以上生存したマウスは腫瘍を完全に拒絶したものとした。これは、60日以上生存したマウスを解剖しても接種部位には組織学的に腫瘍が検出されず、それ以降も転移等で死亡することがなかったという事実に依る。

9. 全身移入試験

予め腫瘍を移植されたヌードマウスの尾静脈よりエフェクター細胞を移入することによりその腫瘍増殖に

及ぼす影響を検討した。CB6F₁ ヌードマウスの皮下に RL σ 1 は 5×10^5 コ, FBL-3 は 5×10^6 コ, 頭蓋内には両腫瘍とも 1×10^4 コを移植し3日後(いずれの腫瘍とも皮下においては4-6mm 前後の腫瘍径に達する) 0.5 ml の HBSS に浮遊させたエフェクター細胞をエーテル麻酔下にゆっくり静脈内投与した。

10. 足蹠反応

FBL-3 あるいは RL σ 1 で免疫した CB6F₁-nu/+マウスの右側後肢足蹠部に放射線照射($10,000 \text{ R}$)した腫瘍細胞を $1 \times 10^7/25 \mu\text{l}$ 接種した。24時間毎に5日目迄足蹠部の厚さを dial caliper にて計測し、足蹠部腫脹をきたした一部マウスの後肢は計測後10%ホルマリンにて固定し組織学的検索を行った。その結果、24-48時間目に単核球とマクロファージの浸潤を伴った強い炎症反応が観察され DTH 反応と考えられた。エフェクター細胞の DTH 反応惹起能を検索する為 CB6F₁ ヌードマウスの足蹠部内に $1 \times 10^7/10 \mu\text{l}$ のエフェクター細胞と放射線照射($10,000 \text{ R}$)した腫瘍細胞 $5 \times 10^6/10 \mu\text{l}$ を混じて接種した。24時間毎に5日まで足蹠部の厚さを同様に計測した。

結 果

1. 免疫脾細胞における CTL の誘導

RL σ 1, あるいは FBL-3 により免疫された CB6F₁-nu/+マウス脾細胞を in vitro でそれぞれの腫瘍細胞と5日間再感作(MLTC)し、種々の腫瘍細胞に対する細胞障害性を ^{51}Cr 遊離細胞障害性試験により測定した(Table 1)。In vivo での腫瘍細胞による感作のみでは免疫した腫瘍細胞にたいして E/T ratio 20:1 で約20%前後の細胞障害性を示したが、MLTC 後は E/T ratio 10:1 で60%以上の高い活性を示した。FBL-3 で免疫された脾細胞は FBL-3 以外に MBL-2, EL-4, 及び NK 感受性 YAC-1 に対しても比較的高い活性を示した。Friend, Moloney, Rauscher の各 virus で誘発された腫瘍は共通抗原性を有すると考えられており MBL-2 に対する交叉細胞障害性(cross cytotoxicity)は CTL がこの共通抗原を認識していることによるものと考えられる。EL-4 との cross reactivity は他にも報告があるが⁷⁴⁾ 詳細は不明である。一方、RL σ 1 で免疫された脾細胞は RL σ 1 に対してのみ高い細胞障害性を有しその特異性において Nakayama らの報告と一致した⁶⁹⁾。

MLTC 細胞を ^{51}Cr 遊離試験前に各抗体で処理し、

Table 1. CYTOTOXIC ACTIVITIES OF IMMUNE SPLEEN CELLS

Target cells	Strain of origin	H-2 haplotype	% Specific lysis by effector cells versus:	
			FBL-3	RL σ 1
FBL-3	C57BL/6	b	68.4 ^{a)}	NT ^{b)}
MBL-2	C57BL/6	b	45.6	NT
EL-4	C57BL/6	b	32.1	2.3 ^{c)}
RL σ 1	BALB/c	d	1.2	64.3
RL σ 6	BALB/c	d	NT	2.6
RL σ 8	BALB/c	d	NT	6.4
RL σ 9	BALB/c	d	0.8	4.2
P815	DBA/2	d	2.3	3.2
YAC-1	A/Sn	a	22.5	1.2

^{a)} and ^{c)} Cytotoxic activity in 5-hr ⁵¹Cr-release assay after 5-day MLTC of in vivo sensitized CB6F₁ spleen cells against either FBL-3 (^{a)} or RL σ 1 (^c). E:T=10:1.

^{b)} Not tested.

in vitro の細胞障害性がどの表面マーカーをもった細胞によるものかを調べると (Fig. 1), 両系において抗 Thy-1.2 抗体と補体及び抗 Lyt-2.2 抗体と補体処理で完全にキラー活性が消失し, 抗 Lyt-1.2 抗体と補体処理で約50%低下することより細胞障害反応は Lyt-1⁺23⁺ と Lyt-1⁺23⁺ の2つのT細胞サブセットにより担われていることが示唆された。

2. 免疫脾細胞における抗腫瘍エフェクター T 細胞サブセットの同定

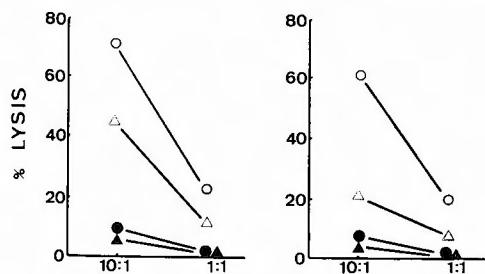
a) 腫瘍中和試験

FBL-3 で免疫された脾細胞と FBL-3 細胞, RL σ 1 で免疫された脾細胞と RL σ 1 細胞を 5:1 の比率で

混和し CB6F₁ スードマウスの背部皮内あるいは頭蓋内に接種後の腫瘍の生着, 増殖を観察した (Table 2). 脾細胞を補体で処理したコントロール群は両系とも腫瘍の増殖を完全に抑制したが, 抗 Thy-1.2 抗体と補体で処理しT細胞を除去した群では両系とも全例のマウスで腫瘍死がみられた. FBL-3 の系においては, 抗 Lyt-2.2 抗体と補体処理後もエフェクター細胞は腫瘍の増殖を完全に抑制したが, 抗 Lyt-1.2 抗体と補体処理では腫瘍は増殖し続けた. 従って本実験においては Lyt-1⁺23⁻ T細胞が腫瘍中和能を有していると考えられた. 一方, RL σ 1 を用いた系では抗 Lyt-1.2 抗体と補体処理後の脾細胞により皮下では約20%のマウスで腫瘍の増殖が抑制されるが, 抗 Lyt-2.2 抗体と補体処理により中和能は消失したことから考えて, いずれの抗体処理でも除去される Lyt-1⁺23⁺ 細胞と Lyt-1⁻23⁺ 細胞がエフェクター細胞として機能していることが推測された. 頭蓋内においても, 皮下の場合とほぼ同じ傾向がみられたがコントロール群においてはこのE/T比の条件下では腫瘍拒絶の頻度は100%に至らなかった.

b) 全身移入試験

予め FBL-3 あるいは RL σ 1 をスードマウスの皮下又は頭蓋内に移植した後, FBL-3 あるいは RL σ 1 で免疫した CB6F₁-nu/+ マウスの脾細胞を尾静脈より全身移入した. 皮下移植腫瘍群 (Table 3a) では 5×10^6 コ以上の免疫脾細胞移入で FBL-3 腫瘍は完全に拒絶されるのに対し, 同量の正常脾細胞の移入では拒絶されなかった. RL σ 1 の系では100%の腫瘍拒絶



EFFECTOR TO TARGET CELL RATIO

Fig. 1. Spleen cells of CB6F₁-nu/+ mice immunized in vivo against either FBL-3 (left) or RL σ 1 (right) were cultured in MLTC for 5 days, and treated with complement alone (○), anti Thy-1.2 (▲), anti Lyt 1.2 (△), or anti Lyt-2.2 (●) and complement, respectively, before 5-hr ⁵¹Cr release assay.

Table 2. NEUTRALIZATION ASSAY AFTER TREATMENT OF EFFECTOR CELLS

Treatment	Number of mice; rejected/tested ^{a)}			
	FBL-3		RL♂1	
	SC	IC	SC	IC
C	10/10	2/5	8/8	2/5
anti Thy-1.2+C	0/11	0/6	0/9	0/6
anti Lyt-1.2+C	0/10	0/6	2/9	1/6
anti Lyt-2.2+C	12/12	2/6	0/8	0/5

^{a)} Each tumor cell was inoculated subcutaneously (SC) or intracranially (IC) together with tumor-immune CB6F₁-nu/+ spleen cells at an E/T ratio of 5:1.

を得るには 1.5×10^8 コ以上の免疫脾細胞の移入を必要とした。又、 2×10^8 コの正常脾細胞の移入によっても腫瘍の拒絶は得られなかった。一方、頭蓋内移植腫瘍群では移植細胞数を両腫瘍系共 1×10^4 コとした場合腫瘍の完全な拒絶を得るには皮下移植腫瘍群の場合と同量の免疫脾細胞の移入を必要とした (Table 3b)。つまり、ほぼ同じ大きさの腫瘍を拒絶させるには RL♂1 の系では FBL-3 の系に比べて約30倍の量の免疫脾細胞の移入が必要であった。次いで腫瘍の拒絶を全例で惹起するに充分量の免疫脾細胞を移入することによりその特異性を検討した (Fig. 2)。CB6F₁ スードマウスにそれぞれ FBL-3, EL-4, RL♂1 を移植した3群を作成し腫瘍の生着した時点で FBL-3 で免疫された CB6F₁-nu/+マウスの脾細胞を移入した。その結

果 FBL-3 のみが拒絶された。一方, RL♂1 の系でも同様に RL♂1 のみが拒絶されその特異性が確認された。

次に、免疫脾細胞中のエフェクター細胞を同定する為リンパ球表面抗原に対するモノクローナル抗体、即ち抗 Thy-1.2, 抗 Lyt-1.2 と抗 Lyt-2.2 抗体と補体を用いて特定のリンパ球集団を除去選別した後、FBL-3 の系では 5×10^6 コ, RL♂1 の系では 1.5×10^8 コに細胞数を調整して担腫瘍ヌードマウスの尾静脈より移入した (Table 4)。その結果、抗 Thy-1.2 抗体と補体処理により T細胞を除去した場合腫瘍拒絶能が完全に消失することより両系において T細胞の移入が腫瘍の拒絶に必須であることが確認された。抗 Lyt 抗体により T細胞サブセットの解析を行うと FBL-3 の系で

Table 3a. DIFFERENCES IN DOSE RESPONSE NECESSARY TO REJECT SC TUMORS AFTER INTRAVENEOUS TRANSFER OF IMMUNE SPLEEN CELLS

Number of spleen cells transferred ^{a)}	Number of mice; rejected/tested			
	FBL-3		RL♂1	
	Immune	Normal	Immune	Normal
20 $\times 10^7$			6/6	0/5
15			10/10	0/6
10			19/34	0/8
5			2/8	0/6
2	23/23	2/6	0/7	
1	19/19	0/6		
0.5	16/16	0/8		
0.1	14/15	0/6		
0.05	4/8			

^{a)} Various numbers of spleen cells were intravenously transferred into CB6F₁-nu/nu mice bearing 3-day tumors.

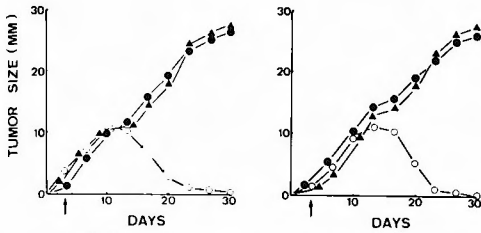


Fig. 2. (left): Spleen cells of CB6F₁-nu/+ mice (5×10^6) immunized with FBL-3 were intravenously transferred into CB6F₁-nu/nu mice inoculated with FBL-3 (○), EL-4 (▲) or RL♂1 (●), respectively, 3 days before. (right): Spleen cells of CB6F₁-nu/+ mice (1.5×10^6) immunized with RL♂1 were intravenously transferred into CB6F₁-nu/nu mice inoculated with RL♂1 (○), RL♀9 (●), or EL-4 (▲), respectively, 3 days before.

は Lyt-1^+ 細胞を除くことにより腫瘍拒絶能が完全に消失するが、 Lyt-23^+ 細胞の除去では全んど影響を受けないことより腫瘍中和試験における同様に Lyt-1^+23^- T細胞が腫瘍の拒絶に必要であり、 Lyt-1^+23^- の CTL はこの条件では腫瘍の拒絶を起こせなかった。RL♂1 の系では Lyt-23^+ 細胞の除去により腫瘍拒絶能が消失することより FBL-3 を用いた系とは対照的に Lyt-23^+ T細胞サブセットの移入が腫瘍の拒絶に重要であることが推測された。

頭蓋内腫瘍移植の群においても皮下腫瘍移植群とはほぼ同じ結果が得られた。

このようにエフェクター細胞の全身移入により腫瘍を拒絶したマウスは再度の腫瘍細胞の移植をも拒絶した。又、FBL-3 を用いた系においては Lyt-1^+23^- 細胞

の移入により腫瘍を拒絶した CB6F₁ ノードマウスの脾細胞は抗 Lyt-2.2 抗体と補体処理により再度 Lyt-1^+23^- 細胞とした後 FBL-3 を皮下に移植された CB6F₁ ノードマウスに移入し腫瘍の拒絶を起こし得ることが確認された (未発表データ)

3. Recipient ノードマウス由来のエフェクター細胞の関与の可能性

以上の実験においては recipient としてノードマウスを使用してきた。ノードマウスは先天的に胸腺を欠損しているため細胞性免疫能が欠如していると考えられるがノードマウスの脾細胞を IL-2 存在下で培養することにより CTL が誘導される、或いは加令と共に成熟 T細胞が出現してくるとの報告がある^{30,39,84)}。このことは移入された免疫脾細胞とノードマウス T細胞 (或いは前駆細胞) との間に相互作用が惹起され、ノードマウス由来のエフェクター細胞が腫瘍拒絶に関与する可能性を示唆している。このような recipient ノードマウス由来のエフェクター細胞が関与しているか否かを検討するため以下の実験を行った。即ち、FBL-3 で免疫された CB10 (Thy-1.1)F₁ マウスの脾細胞移入により皮下移植 FBL-3 を拒絶したノードマウスの脾細胞を 5×10^6 コ、拒 FBL-3 ノードマウスに 2 次移入した。移入前、脾細胞を抗 Thy-1.1 抗体あるいは抗 Thy-1.2 抗体と補体で処理することにより、いずれの場合にも補体による処理の場合と異なり腫瘍拒絶能は消失した (Fig. 3)。更に、このように腫瘍を拒絶した 2 次ノードマウスの脾細胞におけるキラー活性を測定したところ (Table 5)、抗 Thy-1.2 抗体のみで

Table 3b. DIFFERENCES IN DOSE RESPONSE NECESSARY TO REJECT IC TUMORS AFTER INTRAVENOUS TRANSFER OF IMMUNE SPLEEN CELLS

Number of spleen cells transferred ^{a)}	Number of mice; rejected/tested			
	FBL-3		RL♂1	
	Immune	Normal	Immune	Normal
15×10^7			10/10	0/5
10			7/12	0/9
5			0/11	0/8
2			0/9	0/5
1	5/5	0/5		
0.5	8/8	0/7		
0.1	3/6	0/6		

^{a)} Various numbers of spleen cells were intravenously transferred into CB6F₁-nu/nu mice bearing 3-day tumors intracranially.

Table 4. EFFECT OF Ab+C TREATMENT OF IMMUNE SPLEEN CELLS ON THE TUMOR REJECTION AFTER IV TRANSFER

Treatment of immune spleen cells	Number of mice; rejected/tested			
	FBL-3 ^{a)}		RL σ 1 ^{a)}	
	SC	IC	SC	IC
C	16/16	8/10	13/13	10/12
Thy-1.2+C	0/14	0/10	0/11	0/10
Lyt-1.2+C	0/22	0/8	3/17	2/6
Lyt-2.2+C	18/21	6/8	0/16	0/6
Lyt-1.2+C + Lyt-2.2+C	7/9	3/5	0/8	0/5

^{a)} FBL-3-immune spleen cells (5×10^6) or RL σ 1-immune spleen cells (1.5×10^6) were intravenously transferred after treatment into CB6F₁-nu/nu mice bearing 3-day tumors subcutaneously (SC) or intracranially (IC).

なく抗 Thy-1.1 抗体と補体処理でキラー活性が消失した。以上の結果は CB10 (Thy-1.1)F₁ マウスの脾細胞 (H-2d/b, Thy-1.1/Thy-1.2) がヌードマウス内で正常に機能していることを示すばかりでなく、本実験系においては recipient ヌードマウス由来T細胞 (H-2d/b, Thy-1.2) の関与は無視出来ることを示している。また、CB10 (Thy-1.1)F₁ マウスの脾細胞を CB6F₁ ヌードマウスに移入することにより脾腫等の graft-versus-host 反応によると考えられる症状は全く観察されなかった。

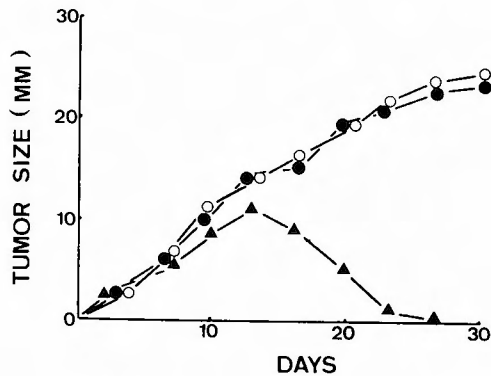


Fig. 3. Spleen cells (5×10^6) of the first recipient of CB6F₁-nu/nu mice, transferred with CB10 (Thy-1.1)F₁ mice immunized in vivo with FBL-3, were treated with complement alone (▲), anti Thy-1.1 (●), or anti Thy-1.2 (○) antibody and complement, respectively, and then intravenously transferred into the second recipients of CB6F₁-nu/nu mice inoculated with FBL-3 3 days before.

4. 腫瘍細胞に対する DTH 反応の惹起

それぞれの腫瘍細胞で免疫された CB6F₁-nu/+ マウスにおいて 10,000 R 照射した腫瘍細胞を右後肢足趾部に接種しその腫脹を経時的に観察し計測した。その結果、FBL-3 で免疫された CB6F₁-nu/+マウスは FBL-3 に対してのみ強い足趾部腫脹を認めた (Fig. 4a)。一方、RL σ 1 の系では RL σ 1, EL-4, YAC-1 のいずれの腫瘍に対しても足趾部腫脹を示さなかった。FBL-3 の系で同腫脹は接種24—48時間後に 4.0 ± 0.5 mm と最も強く 7 日後には正常値に復していた。組織学的には24—48時間後に単核球とマクロファージを中

Table 5. CYTOTOXIC ACTIVITY INDUCED IN SPLEEN CELLS FROM THE SECOND RECIPIENTS OF TUMOR-REJECTED CB6F₁-nu/nu MICE ARE MAINLY DERIVED FROM DONOR CELL

Treatment ^{a)}	Cytotoxic activity	
	20:1 ^{b)}	5:1
C	65.3	45.3
anti-Thy-1.1+C	10.5	4.3
anti-Thy-1.2+C	8.6	2.4
anti-aGM1 +C	49.6	37.4

^{a)} The spleen cells from the second recipients of CB6F₁-nu/nu mice, which had rejected the SC-inoculated FBL-3 tumor by transfer of spleen cells of the first recipient, were treated after 5-day MLTC.

^{b)} Effector to target cell ratio.

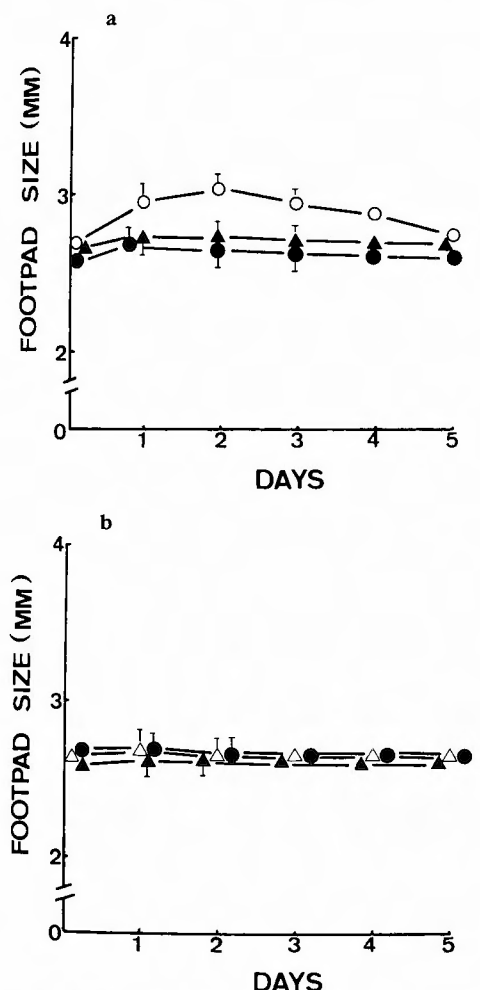


Fig. 4. Differences in footpad reactions between two tumor systems.

a) CB6F₁ mice immunized with FBL-3 were challenged with irradiated (10,000 R) FBL-3 (○), EL-4 (▲), or YAC-1 (●), respectively, at a dose of $1 \times 10^7/0.025$ ml into right hind footpad.

b) CB6F₁ mice immunized with RL♂1 were challenged with irradiated (10,000 R) RL♂1 (△), EL-4 (●), or YAC-1 (▲), respectively, at a dose of $1 \times 10^7/0.025$ ml into right hind footpad.

Footpad size was measured everyday until day 5. The results represent the means ($\pm$ SD) of eight mice.

心とする細胞浸潤が強くみられ DTH 反応と考えられた。

このような反応は Lyt-1^+23^- 脾細胞を移入され FBL-3 を拒絶したヌードマウスにおいても同様にみられ腫

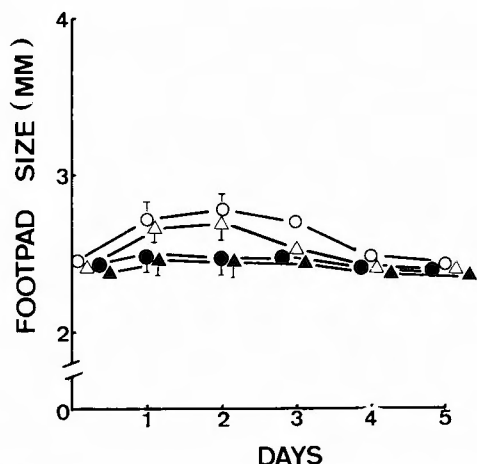


Fig. 5. Effector subpopulation necessary to mediate footpad reaction against irradiated FBL-3 cells.

Spleen cells of CB6F₁-nu/+ mice immunized with FBL-3 in vivo were treated with complement (C) alone (○), anti-Thy-1.2 (▲), anti-Lyt-1.2 (●), or anti-Lyt-2.2 (△) antibodies and complement, respectively. The treated cells ($1 \times 10^7/0.01$ ml) were injected together with irradiated (10,000 R) FBL-3 ($5 \times 10^6/0.01$ ml) into right hind footpad of CB6F₁-nu/nu mice.

Footpad size was measured everyday until day 5. The results represent the means ($\pm$ SD) of six mice.

瘍拒絶能ばかりでなく DTH 反応も Lyt-1^+23^- 細胞でヌードマウスに移入できることが示された (未発表データ)。一方、FBL-3 で免疫された CB6F₁-nu/+マウスの脾細胞と放射線照射した FBL-3 細胞を混じて CB6F₁ヌードマウスの足趾部に接種することによっても DTH 反応が惹起された。そして、免疫脾細胞を抗-Thy-1.2 抗体や抗-Lyt 抗体と補体処理後に、同反応を惹起してみると抗-Thy-1.2 抗体と補体、或は抗-Lyt-1.2 抗体と補体処理により免疫脾細胞の DTH 反応惹起能が消失することより、同反応のエフェクターは Lyt-1^+23^- 細胞であることが明らかとなった (Fig. 5)。

6. FBL-3 腫瘍系における腫瘍拒絶エフェクター細胞としての CTL の関与

FBL-3 の系において腫瘍の拒絶を得るには 5×10^6 コの Lyt-1^+23^- 細胞で充分であるが、同量の Lyt-1^+23^- 細胞の移入では腫瘍の拒絶はみられなかった (Table 4)。いわゆる CTL (Lyt-23^+ T細胞サブセット) がこの系の腫瘍拒絶に関与しているか否かを再度検討

Table 6. EFFECT OF Lyt-1-23⁺ CELLS ON BOTH NEUTRALIZATION AND TRANSFER STUDIES IN FBL-3 TUMOR SYSTEM

In vivo assay ^{a)}	Cell number (E:T)	Number of mice; rejected/tested
Neutralization ^{b)}	4×10 ⁶ (2:1)	0/5
	2×10 ⁷ (10:1)	5/8
Systemic transfer ^{c)}	5×10 ⁶	0/10
	1×10 ⁷	2/6
	2×10 ⁷	9/9

^{a)} Immune spleen cells against FBL-3 were treated with anti Lyt-1.2 antibody and complement, and then used in this experiments as effector cells.

^{b)} Effector cells were mixed with 2×10⁶ FBL-3 cells in a total volume of 0.1 ml, and injected on the back of CB6F₁-nu/nu mice.

^{c)} Effector cells were intravenously transferred into CB6F₁-nu/nu mice which had been inoculated with 5×10⁶ FBL-3 cells subcutaneously 3 days before.

するため以下の実験を行なった。まず免疫脾細胞の Lyt-1-23⁺ 細胞を、腫瘍中和試験において E/T 比を上げ10:1とすると半数以上のマウスで腫瘍の増殖が阻止された (Table 6)。移入試験において1×10⁷ コ以上の Lyt-1-23⁺ 細胞の移入で腫瘍の拒絶例がみられ 2×10⁷ コでは100%腫瘍を拒絶した。つまり FBL-3 腫瘍細胞の拒絶は Lyt-1-23⁺ 細胞ばかりでなく細胞数に依存して Lyt-1-23⁺ 細胞によっても惹起し得ることが示された。

次いで、既に報告した RL♂1 の系で樹立したのと同じ方法で FBL-3 に対する CTL line, 及び non-CTL line を作成した。CTLL-E2 は in vitro で FBL-3 に対

Table 7. CYTOTOXIC ACTIVITY OF CYTOTOXIC AND NONCYTOTOXIC T CELL LINES

Target cells	Effector cells	
	CTLL-E2	E2n
FBL-3	56.4 ^{a)}	3.2
MBL-2	38.5	1.2
YAC-1	3.1	0.6
EL-4	4.4	0
P815	0	0
RL♂1	0	0

^{a)} % lysis at an E/T ratio of 10:1.

Table 8. NEUTRALIZATION ASSAY OF BOTH CYTOTOXIC AND NONCYTOTOXIC T CELL LINES IN NUDE MICE

Tumor	Number of mice; rejected/tested			
	SC		IC	
	CTLL-E2 ^{a)}	E2n ^{b)}	CTLL-E2	E2n
FBL-3	10/10	0/8	7/9	0/10
EL-4	0/6		0/8	
RL♂1	0/6		0/7	

^{a)} CTLL-E2 cells were mixed together with various tumor cells at an E/T ratio of 10:1 and injected in the back of CB6F₁-nu/nu mice.

^{b)} E2n cells were mixed with various tumor cells at an E/T ratio of 10:1 and injected.

して高い細胞障害性を示したが、Lyt-1+23⁻ サブセットより成る E2n はどの腫瘍細胞に対しても活性を有しなかった (Table 7)。この2つの培養細胞株を in vivo に投与し腫瘍の増殖に及ぼす影響を検討した。その結果、CTLL-E2 は皮下での腫瘍中和試験及び全身移入試験の両方において免疫脾細胞より少ない細胞数で腫瘍の増殖を完全に抑制した (Table 8, 9)。とくに頭蓋内移植腫瘍モデルにおいて、CTLL-E2 は腫瘍中和試験で免疫脾細胞に比べ強く腫瘍の増殖を抑制した。一方, noncytotoxic T cell line, E2n は腫瘍の増殖を何ら抑制できなかった。E2n はほぼ100% Lyt-1+23⁻ 細胞より成るが腫瘍に対する反応性はなく脾細胞中の FBL-3 反応性 Lyt-1+23⁻ 細胞と異なりこのサブセット単独では腫瘍の拒絶を起こしえなかった。CTLL-E2 と E2n 細胞の DTH 惹起能を検討した (Fig. 6)。CTLL-

Table 9. SYSTEMIC TRANSFER OF CYTOTOXIC AND NONCYTOTOXIC T CELL LINES INTO NUDE MICE

Tumor	Number of mice; rejected/tested			
	SC		IC	
	CTLL-E2 ^{a)}	E2n ^{b)}	CTLL-E2	E2n
FBL-3	10/10	0/11	8/8	0/12
EL-4	0/6		0/5	
RL♂1	0/6		0/5	

^{a)} CB6F₁-nu/nu mice, inoculated with the tumor cells 3 days before, were intravenously transferred with CTLL-E2 cells at a dose of 5×10⁶/0.5ml.

^{b)} CB6F₁-nu/nu mice, inoculated with the tumor cells 3 days before, were intravenously transferred with E2n cells at a dose of 1×10⁷.

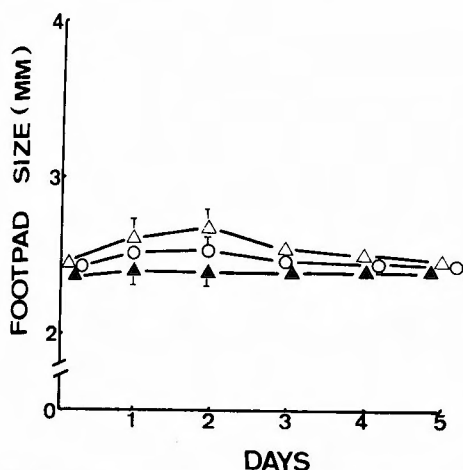


Fig. 6. Differences in capacity to induce footpad reaction between immune spleen cells and cultured cell lines. Effector cells ($1 \times 10^7/0.01$ ml, Δ FBL-3-immune spleen cells treated with anti Lyt-2.2 and complement, $\circ$ CTLL-E2, $\blacktriangle$ E2n) were injected together with irradiated ($10,000$ R) FBL-3 into right hind footpad of CB6F₁-nu/nu mice. Footpad size was measured everyday until day 5. The results represent the means ($\pm$ SD) of six mice.

E2あるいはE2n細胞と放射線照射したFBL-3細胞を混じりCB6F₁ヌードマウスの足趾部に接種しその腫脹の有無を観察した。その結果、CTLL-E2では弱い腫脹がみられるがE2n細胞ではDTH反応を惹き出せないことがわかった。つまりE2nを構成するLyt-1⁺23⁻細胞は表面マーカーは同じながら脾細胞中のLyt-1⁺23⁻細胞とは機能的に異なるものと推察された。

考 察

幾つかの腫瘍細胞について、その細胞表面には固有抗原、いわゆる腫瘍特異抗原の存在することが報告されている^{60,63}。このような非自己性抗原に対する免疫応答を通して、個体は腫瘍を排除するための機構を発動すると考えられ、このことが腫瘍に対する免疫療法の基礎となっている。腫瘍細胞の排除に関与するエフェクター群は単一ではなく、機能的、細胞学的に異なる諸種の細胞から構成されると考えられるが現在迄に報告された多くの実験系において、腫瘍排除に関与する中心的なエフェクターはT細胞であり、T細胞の非存在下では腫瘍の排除は生じ得ないことが確認されている^{7,27,32,37,62,71}。しかしながら、どのようなT細胞

サブセットが腫瘍排除の中心的エフェクターであるかについては未だ充分に明らかにされていない。免疫療法を考える上で、個々の腫瘍に対して発現するT細胞サブセットが異なるか否かという問題点を明らかにすることは、選択的にT細胞サブセット機能を増強、或いは全身投与の為のエフェクターT細胞株を樹立する上で、又個体の腫瘍に対する反応性を判断する指標、即ち対応するT細胞サブセットの機能が充分か否かを考慮する等の面より最も重要と考えられる。以上の観点より、私達は2つのマウス可移植腫瘍を用い免疫により産生される腫瘍排除能を有するT細胞サブセットの比較解析を行った。

FBL-3はC57BL/6マウスにFriend virusで誘発されたlymphomaでvirus関連抗原を有し、それはMoloneyやRauscher virusで誘発されたものと一部共通の構造をもっていると考えられている。一方放射線照射によりBALB/cマウスに誘発されたleukemia RL σ 1はその表面に腫瘍抗原と考えられるユニークな抗原を有しているとされている⁶⁰。両腫瘍細胞は共に皮下及び脳内移植後固形腫瘍を形成する。しかし、FBL-3はsyngeneic hostであるC57BL/6、あるいはsemisyngeneicであるCB6F₁マウスにおいて皮下に 1×10^7 コ以下の細胞数で移植した場合2週間で15 mm前後の腫瘍径に達した後自然退縮し、その後の 1×10^7 コ以上の同腫瘍の接種をも拒絶し免疫が成立する。一方、RL σ 1に関しては、syngeneic hostであるBALB/cマウスには抗腫瘍免疫は成立しないがC57BL/6とのF₁であるCB6F₁においては強い抗腫瘍免疫が成立する。免疫脾細胞は免疫した腫瘍細胞に対して細胞障害性を示し、その活性はin vitroで腫瘍細胞との間でMLTCを行うことにより高められ、腫瘍特異性を示し(Table 1)、そして両腫瘍系においてLyt-1⁺23⁺、Lyt-1⁻23⁺T細胞により担われていることが明らかとなった(Fig. 1)。免疫脾細胞の担腫瘍ヌードマウスへの全身移入試験では100%腫瘍拒絶能を移入出来る最少細胞数に大きな違いがあり、RL σ 1の系では1匹のマウスの脾細胞数に相当する 1.5×10^8 コ以上を必要としこれはFBL-3の系の約30倍の細胞数に値する(Table 3a, 3b)。しかし、腫瘍拒絶時の腫瘍径並びに時間的推移には大差がなく、エフェクター細胞移入後4週間前後で両系とも完全に腫瘍は消失した。

それぞれの腫瘍により免疫されたマウスの脾細胞に関しin vivoにおける抗腫瘍免疫エフェクター能を比較解析すると(Table 2, 4)、RL σ 1の系では腫瘍中和

及び全身移入試験において腫瘍拒絶能は抗 Thy-1, 抗 Lyt-2 抗体と補体処理で完全に消失し, 抗 Lyt-1 抗体と補体処理で僅かに腫瘍拒絶例がみられたのみであることより T 細胞であり Lyt-1 と Lyt-2 抗原の両方を有する Lyt-1⁺23⁺, 並びに Lyt-1⁺23⁻ サブセットがエフェクターであることが示唆され, 一方 FBL-3 の系では Lyt-1⁺23⁻ サブセット単独にて腫瘍の拒絶が惹起されたが Lyt-1⁺23⁺ サブセットのみでは腫瘍の拒絶はみられなかった. しかしながら, 抗 Lyt-1 抗体と補体で処理された細胞 (Lyt-1⁺23⁺ サブセット) を移入時, 細胞数を約 5 倍に増量することにより腫瘍拒絶能の回復がみられたことから考えて (Table 6), FBL-3 の系では Lyt-1⁺23⁻ 及び Lyt-1⁺23⁺ サブセットの両者ともエフェクターであると考えられた. Lyt-23⁺ の CTL サブセットが FBL-3 を用いた系にてもエフェクターであることは, FBL-3 に特異性を有する CTL line, CTLL-E2, をエフェクター細胞として用いた実験によっても確認された (Table 8, 9).

移植された腫瘍に対してリンパ球の移入により治療させようとする試みは以前より行われてきたが^{37,71)}, 大量の免疫リンパ球を必要とした³⁾ 為 in vitro で再感作し細胞障害性を高めたリンパ球の移入が試みられた^{1,40)}. 一方, IL-2 を用いて長期間にわたり高い細胞障害性を維持したままリンパ球を培養出来るようになり²⁹⁾, 培養リンパ球を使用した adoptive immunotherapy の報告が相次いだ^{8,19,20,31,72)}. 更に限界希釈法によるクローニングを利用して IL-2 依存性 CTL クローンが容易に作成出来るようになった^{12,14,22,23,54,74,82,83,85,87)}. このような中で, 腫瘍拒絶のエフェクター T 細胞の同定が進められ, in vitro で直接腫瘍細胞を障害する Lyt-23⁺ の CTL が in vivo でもエフェクターであるとの報告がみられた^{21,65,83,87)}. しかし, allograft rejection の系で Loveland らが⁵³⁻⁵⁵⁾, 同系腫瘍拒絶の系で Fernandez-Cruz らが^{24,25)} in vitro で細胞障害性を示さない T 細胞で拒絶能を移入出来ることを発表して以来, 相次いで Lyt-1⁺23⁻ サブセットのエフェクター細胞としての重要性が論じられ^{2,6,28,33,47)}, in vitro で細胞障害性を有する CTL がそのまま in vivo でもエフェクターとして働きうると考えられてきた移植免疫, 腫瘍免疫の分野で混乱が生じてきた.

Shimizu らは⁸¹⁾ メチルコラントレン誘発腫瘍 Meth 4 を用いた腫瘍中和試験で腫瘍の増殖を抑えるのは Lyt-1⁺23⁺ 細胞であることを報告しているが, これは私達の RL♂1 の系での結果と一致する. Murine sar-

coma virus で誘発された sarcoma は強い DTH 反応, 抗 virus 抗体を産生させ Lyt-1⁺23⁻ 細胞がエフェクターとなり, Moloney leukemia virus 誘発腫瘍 MBL-2 は Lyt-1⁺23⁺ 細胞がエフェクターとなり腫瘍の拒絶がおこる⁵⁰⁾, あるいはメチルコラントレン誘発腫瘍 Meth A は Lyt-1⁺23⁺ 細胞で, Friend virus 誘発腫瘍 FBL-3 は Lyt-1⁺23⁻ と Lyt-1⁺23⁺ サブセットの共存下に腫瘍の拒絶がおこる⁷³⁾など腫瘍によりエフェクター細胞に異同がみられるとの報告は以前にもみられた. その理由の説明として, 腫瘍の誘発方法を含めた抗原性の違い⁷³⁾が考えられている. しかし, 同系腫瘍拒絶で Lyt-1⁺23⁻ サブセットがエフェクターとする報告の中には virus 誘発腫瘍を使ったものが多いが^{24,33,50)}, 化学剤誘発腫瘍でもみられ^{6,25)}, 一方 CTL がエフェクター細胞とする報告の中にも virus 誘発腫瘍を使った報告もみられ^{23,50)}, 単純に腫瘍の誘発方法の違いによるものとは断定出来ない.

本実験において FBL-3 腫瘍を用いた系では, 腫瘍の排除は Lyt-1⁺23⁻ サブセットの単独移入によっても惹起されたが, Lyt-1⁺23⁻ サブセットは遅延型過敏症反応のエフェクター細胞でもあると考えられていることより同反応との関係を調べると FBL-3 の系では腫瘍特異的な強い DTH 反応が観察されるのに反し, RL♂1 の系では同反応は殆ど観察されなかった (Fig. 4a, 4b). 移植片の拒絶と DTH 反応との関係は以前より論じられているが³⁵⁾, 近年 Lyt-1⁺23⁻ 細胞の移入で allograft や allogeneic tumor の拒絶が誘導され⁵⁵⁾, 又マウスで強い足腫反応が観察されている⁵³⁾. そして, 同系腫瘍拒絶の系でも同様の結果が確認されている²⁸⁾. このような実験結果は, 本研究の結果と考え併せた場合, 腫瘍の DTH 誘導能と Lyt-1⁺23⁻ エフェクターサブセット出現との相関を示唆していると考えられる. DTH を惹起するエフェクターと腫瘍拒絶のエフェクターが同一であるか否かについては現在の所不明であるが, それぞれの誘導能を有する T 細胞クローンを樹立し解析を行うことが必要であると思われる.

また, RL♂1 と FBL-3 という 2 つの腫瘍を用いた実験結果から早急に結論を下すことはできないが, 産生される抗腫瘍 T 細胞サブセットは対応する腫瘍細胞の抗原性に依存して多様性を示すものの, CTL は共通してエフェクター細胞であり得る可能性が示唆され, これは他の腫瘍細胞による実験を行うことにより例証可能であると考えられる.

全身移入試験によるエフェクター細胞機構解析の際

大切な点は、移入した donor 由来の細胞がどの程度 recipient 内で動きうるか、又 recipient 側の免疫担当細胞はどの程度関与しているかである。免疫脾細胞移入60日後には5%、120日後には2%以下の donor 由来の細胞しか recipient マウスの脾細胞中に認められなかったが細胞障害性を保持し、recipient 側の細胞には何ら活性がみられなかったとされている³⁴⁾。一方、腫瘍の拒絶を起こすには細胞を移入される recipient 側のT細胞機能は抑制されている必要があり、それはサプレッサーT細胞の関与によるものと考えられている^{57,61,62)}。本研究においては recipient マウスに胸腺を欠損し細胞性免疫能を欠くと考えられているヌードマウスを用いた。これは従来の研究に用いられたような致死量以下の全身放射線照射マウス^{20,21,24,25,47)}、或いは胸腺摘出後 800 R 照射し、抗 Thy-1 抗体と補体で処理した骨髓細胞を移入した ATXB マウス^{28,53,54)}などの使用に比し作成に煩雑さがなく、又残存胸腺機能を考慮せずにすむ等均質な個体集団として利用できる利点を有する。ATXB マウスにおいても recipient 由来の CTL の関与は否定できず^{13,17,18,52)}、ヌードマウスにおいても IL-2 存在下に培養すると CTL が誘導される^{30,39,84)} との報告もみられるが、本実験系においては recipient 由来のT細胞(或いはその前駆細胞)の関与の可能性は donor 細胞として Thy-1 アロ抗原系に関する congenic なマウスを使用した実験においてある程度否定できた (Table 5)。

IL-2 存在下に樹立された CTL クローンによる特異的免疫療法が試みられている^{12,14,65,74,87)} が、長期培養で特異性が失われる場合のあること⁸²⁾、あるいは in vivo 投与後は肺等に捕捉されて脾、リンパ節、腫瘍周囲には殆ど移行しないこと^{11,51)} 等問題が提起されている。移入細胞の in vivo での効果を高めるため IL-2 の併用投与も試みられているが^{9,10,16,65)}、IL-2 の静脈内投与後の血中半減期は非常に短く速やかに腎から排出され^{15,58)}、又血中に IL-2 inhibitor も存在する³⁶⁾とも考えられており、IL-2 依存性T細胞株を用いた免疫療方は今後解決されなければならない問題を残している。

私達の樹立した IL-2 の添加を必要しない長期培養可能な CTL line は、3つのT細胞サブセットよりなる株であり Lyt-1+23⁻ サブセットが feeder cell の Ia に反応して IL-2 などのリンフォカインを産生し Lyt-23⁺ 細胞を増殖させ細胞障害性を維持しているものと考えられ^{48,49)}、又 cell size の周期的変化が継代に

際しみられるなど MLC で長期培養維持される細胞に類似する。in vivo 投与により FBL-3 腫瘍の排除を惹起するのはこの細胞株を構成する3つのサブセットのリンパ球集団が協同的に働くものと推定される⁴⁸⁾。

本研究で皮下移植モデルと並行して頭蓋内移植腫瘍モデルにおいてもエフェクター細胞の同定を行った。その結果、エフェクターT細胞サブセットは皮下モデルと同一であることを示唆する結果を得たが、移植する腫瘍細胞数が少ないにもかかわらず皮下移植腫瘍に対する免疫応答に比べ反応の程度は低かった。従来より脳内は“Immunologically privileged site”と言われていたが⁵⁶⁾、近交系マウスを使った実験より脳内においても免疫応答が起るものと考えられている^{26,44,46,66,75-77)}。そして脳内移植腫瘍に対する adoptive immunotherapy のモデルがいくつか報告され^{44,69,70,76,87)}、臨床応用への期待がよせられている。私達の実験でも脳内局所中和試験においては in vitro で細胞障害性の高められた CTL line が免疫脾細胞より有効であり、悪性脳腫瘍が頭蓋外への転移の少ないことも考え合わせると local adoptive immunotherapy に期待がよせられる。

結 語

1. 放射線照射誘発白血病細胞 RL σ 1 と Friend virus 誘発リンパ腫 FBL-3 の2つのマウス腫瘍について、ヌードマウスを用いた皮下及び頭蓋内移植腫瘍モデルを作成し免疫脾細胞による抗腫瘍免疫エフェクターT細胞サブセットの解析を行った。その結果、腫瘍中和試験並びに全身移入試験において、RL σ 1 の系では Lyt-23⁺ (Lyt-1+23⁺, Lyt-1-23⁺) T細胞サブセットが、FBL-3 の系では Lyt-23⁺ に加えて Lyt-1+23⁻ 細胞がエフェクター細胞として機能し腫瘍を退縮させ得ることが示された。
2. FBL-3 系において腫瘍細胞に対する特異的な遅延型過敏症反応が観察されたが、RL σ 1 の系では認められず、腫瘍の抗原性の差異が誘導するエフェクターサブセットの多様性に関与していることが示唆された。
3. 皮下と頭蓋内移植腫瘍モデルにおいてエフェクターT細胞のサブセットに異同はなかった。
4. IL-2 の添加を必要とせずに増殖する FBL-3 に対する CTL line (CTL-E2) は Lyt-2⁺ 細胞が80%以上を占める長期培養可能な CTL 株であり in vivo において特異的な腫瘍拒絶能を示し、このような方

法で樹立された CTL 株は、今後種々の腫瘍に応用可能であると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました京都大学脳神経外科教授半田 肇先生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講師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免疫研究施設助教授増田 徹先生、同助手栗林景容先生、Johhs Hopkins 大学坂口志文博士に深謝いたします。また、放射線誘発白血病細胞を御供与いただき御指導頂きました長崎大学医学部助教授中山 睿一先生に感謝の意を表します。

References

- Bernstein ID: Passive transfer of systemic tumor immunity with cells generated in vitro by a secondary immune response to a syngeneic rat gross virus-induced lymphoma. *J Immunol* **118**: 122-128, 1977.
- Bhan AK, Perry LL, et al: The role of T cell sets in the rejection of a methylcholanthrene-induced sarcoma (S1509a) in syngeneic mice. *Am J Pathol* **102**: 20-27, 1981.
- Borberg H, Oettingen HF, et al: Inhibition of established transplants of chemically induced sarcoma in syngeneic mice by lymphocytes from immunized donors. *Int J Cancer* **10**: 539-547, 1972.
- Cantor H and Boyse EA: Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens I. The generation of functionally distinct T-cell subclasses is a differentiative process independent of antigen. *J Exp Med* **141**: 1376-1389, 1975.
- Cantor H and Boyse EA: Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. II. cooperation between subclasses of Ly⁺ cells in the generation of killer activity. *J Exp Med* **141**: 1390-1399, 1975.
- Carter RH, Drebin JA, et al: Regulation of the immune response to tumor antigen. IX. In vitro Lyt-1+23⁻ cell proliferative response to cellbound or subcellular tumor antigen. *J Immunol* **130**: 997-1002, 1983.
- Cerottini JC and Brunner KT: Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection and tumor immunity. *Adv Immunol* **18**: 67-132, 1974.
- Cheever MA, Greenberg PD, et al: Specific adoptive therapy of established leukemia with syngeneic lymphocytes sequentially immunized in vivo and in vitro and nonspecifically expanded by culture with interleukin 2. *J Immunol* **126**: 1318-1322, 1981.
- Cheever MA, Greenberg PD, et al: Augmentation of the anti-tumor therapeutic efficacy of long-term cultured T lymphocytes by in vivo administration of purified interleukin 2. *J Exp Med* **155**: 968-980, 1982.
- Cheever MA, Greenberg PD, et al: Interleukin 2 administered in vivo induces the growth of cultured T cells in vivo. *J Immunol* **132**: 2259-2265, 1984.
- Dailey MO, Fathman CG, et al: Abnormal migration of T lymphocytes clones. *J Immunol* **128**: 2134-2136, 1982.
- Dailey MO, Pillemer E, et al: Protection against syngeneic lymphoma by a long-lived cytotoxic T cell clone. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 5384-5387, 1982.
- Dallman MJ, Mason DW, et al: The roles of host and donor cells in the rejection of skin allografts by T cell-deprived rats injected with syngeneic T cells. *Eur J Immunol* **12**: 511-518, 1981.
- DeVries JE and Spits H: Cloned human cytotoxic T 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.
- Donohue JH and Rosenberg SA: The fate of interleukin-2 after in vivo administration. *J Immunol* **130**: 2203-2208, 1983.
- Donohue JH, Rosenstein M, et al: The systemic administration of purified interleukin 2 enhances the ability of sensitized murine lymphocytes to cure a disseminated syngeneic lymphoma. *J Immunol* **132**: 2123-2128, 1984.
- Duprez V, Hamilton B, et al: Generation of cytolytic T lymphocytes in thymectomized, irradiated, and bone marrow-reconstituted mice. *J Exp Med* **156**: 844-859, 1982.
- Duprez V, Maziarz R, et al: Thymectomized, irradiated, and bone marrow-reconstituted chimeras have normal cytolytic T lymphocyte precursors but a defect in lymphokine production. *J Immunol* **132**: 2185-2189, 1984.
- Eberlein TJ, Rosenstein M, et al: Generation of long-term T-lymphoid cell lines with specific cytotoxic reactivity for a syngeneic murine lymphoma. *J Natl Cancer Inst* **69**: 109-116, 1982.
- Eberlein TJ, Rosenstein M, et al: Regression of a disseminated syngeneic solid tumor by systemic transfer of lymphoid cells expanded in interleukin 2. *J Exp Med* **156**: 385-397, 1982.
- Engers HD, Sorenson GD, et al: Functional activity in vivo of effector T cell populations. I. Antitumor activity exhibited by allogeneic mixed leukocyte culture cells. *J Immunol* **129**: 1292-1298, 1982.
- Engers HD, Glasebrook AL, et al: Allogeneic tumor rejection induced by the intravenous injection of Lyt-2⁺ cytolytic T lymphocyte clones.

- J Exp Med **156**: 1280-1285, 1982.
- 23) Engers HD, Lahaye T, et al: Functional activity in vitro effector T cell populations. II. Antitumor activity exhibited by syngeneic anti-MoMULV-specific cytolytic T cell clones. J Immunol **133**: 1664-1670, 1984.
- 24) Fernandez-Cruz E, Woda BA, et al: Elimination of syngeneic sarcoma in rats by a subset of T lymphocytes. J Exp Med **152**: 823-841, 1980.
- 25) Fernandez-Cruz E, Gilman SC, et al: Immunotherapy of a chemically-induced sarcoma in rats: characterization of the effector T cell subset and nature of suppression. J Immunol **128**: 1112-1117, 1982.
- 26) Fioretti MC, Circolo A, et al: Immunotherapy studies with murine lymphoma cells growing in mouse brain. I. Studies with tumor-associated histocompatibility antigens. Cancer Immunol Immunother **9**: 145-152, 1980.
- 27) Freedman LR, Cerottini JC, et al: In vivo studies of the role of cytotoxic T cells in tumor allograft immunity. J Immunol **109**: 1371-1378, 1972.
- 28) Fujiwara H, Fukuzawa M, et al: 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.
- 29) Gillis S and Smith KA: Long-term culture of tumor-specific cytotoxic T cells. Nature (Lond.) **268**: 154-155, 1977.
- 30) Gillis S, Union NA, et al: The in vitro generation and sustained culture of nude mouse cytolytic T-lymphocytes. J Exp Med **149**: 1460-1476, 1979.
- 31) Giorgi JV and Warner NL: Continuous cytotoxic T cell lines reactive against murine plasmacytoma tumor-associated antigens. J Immunol **126**: 322-330, 1981.
- 32) Gorczynski RM: Evidence for in vivo protection against murine sarcoma virus-induced tumor by T lymphocytes from immune animals. J Immunol **112**: 533-539, 1974.
- 33) Greenberg PD, Cheever MA, et al: Eradication of disseminated murine leukemia by chemimmunotherapy with cyclophosphamide and adoptively transferred immune syngeneic Lyt-1+2- lymphocytes. J Exp Med **154**: 952-963, 1981.
- 34) Greenberg PD and Cheever MA: Treatment of disseminated leukemia with cyclophosphamide and immune cells: tumor immunity reflects long-term persistence of tumor-specific donor T cells. J Immunol **133**: 3401-3407, 1984.
- 35) Halliday WJ and Webb M: Delayed hypersensitivity to chemically induced tumors in mice and correlation with an in vitro test. J Natl Cancer Inst **43**: 141-149, 1969.
- 36) Hardt C, Rölinghoff M, et al: Lyt-23+ cyclophosphamide-sensitive T-cells regulate the activity of an interleukin 2 inhibitor in vivo. J Exp Med **154**: 262-274, 1981.
- 37) Howell SB, Dean JH, et al: Cell interaction in adoptive immune rejection of syngeneic tumor. Int J Cancer **14**: 662-674, 1974.
- 38) Huber B, Cantor H, et al: Independent differentiative pathways of Lyt-1 and Ly-23 subclasses of T cells. J Exp Med **144**: 1128-1133, 1976.
- 39) Hünig T and Bevan MJ: Specificity of cytotoxic T cells from athymic mice. J Exp Med **152**: 688-702, 1980.
- 40) Kedar E and Weiss DW: The in vitro generation of effector lymphocytes and their employment in tumor immunotherapy. Adv Cancer Res **38**: 171-287, 1983.
- 41) Keyaki A, Sakaguchi S, et al: Establishment of tumor specific CTL line and effect of in vivo administration. Proc Jap Soc Immunol **13**: 484-485, 1983.
- 42) Keyaki A, Kuribayashi K, et al: Analysis of T cell in syngeneic tumor rejection in mice. Proc Jap Soc Immunol **14**: 315, 1984.
- 43) Keyaki A, Handa H, et al: Growth-inhibitory effect of prostaglandin D₂ on mouse glioma cells. J Neurosurg **61**: 912-917, 1984.
- 44) Keyaki A, Handa H, et al: Antilymphoma graft immunity in the mouse brain: adoptive immunotherapy in the experimental model. The An Meet Amer Assoc Neurol Surg (Scientific manuscript): 72-73, 1985.
- 45) Keyaki A, Kuribayashi K, et al: Effector mechanisms of syngeneic anti-tumour responses in mice. II. Cytotoxic T lymphocytes mediate neutralization and rejection of radiation-induced leukemia RL σ 1 in the nude mouse system. Immunol **56**: 141-151, 1985.
- 46) Kida Y, Cravioto H, et al: Immunity of transplantable nitrosourea-induced neurogenic tumors. II. Immunoprophylaxis of tumors of the brain. J Neuropathol Exp Neurol **42**: 122-135, 1983.
- 47) Kim B, Rosenstein M, et al: Clonal analysis of the lymphoid cells mediating skin allograft rejection: cloned Lyt-1+2- proliferative, noncytotoxic long term cell lines mediate graft rejection in vivo. Transplantation **36**: 525-532, 1983.
- 48) Kuribayashi K, Keyaki A, et al: Analysis of the growth mechanism of tumor-specific CTL line: central role of syngeneic MLR. Proc Jap Soc Immunol **13**: 450-451, 1983.
- 49) Kuribayashi K, Keyaki A, et al: Effector mechanisms of syngeneic antitumour responses in mice.

- I. Establishment and characterization of an exogenous IL-2-independent cytotoxic T-lymphocyte line specific for radiation-induced leukemia RL δ 1. *Immunol* 56: 127-140, 1985.
- 50) Leclerc JC and Cantor H: T cell-mediated immunity to oncornavirus-induced tumors. II. Ability of different T cell sets to prevent tumor growth in vivo. *J Immunol* 124: 851-854, 1980.
- 51) LeFever A, Truitt R, et al: Migration patterns and functional activity of cloned cytotoxic T lymphocytes in syngeneic and allogeneic mice. *Transplantation* 37: 410-417, 1984.
- 52) LeFrancis L and Bevan MJ: A reexamination of the role of Lyt-2-positive T cells in murine skin graft rejection. *J Exp Med* 159: 57-67, 1984.
- 53) Loveland BE, Hogarth PM, et al: Cells mediating graft rejection in the mouse. I. Lyt-1 cells mediate skin graft rejection. *J Exp Med* 153: 1044-1057, 1981.
- 54) Loveland BE and McKenzie IFC: Cells mediating graft rejection in the mouse. II. The Lyt phenotypes of cells producing tumor allograft rejection. *Transplantation* 33: 174-180, 1982.
- 55) Loveland BE and McKenzie IFC: Which T cells cause graft rejection? *Transplantation* 33: 217-221, 1982.
- 56) Medawar PB: Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Brit J Exp Path* 29: 58-69, 1948.
- 57) Mills CD and North RJ: Expression of passively transferred immunity against an established tumor depends on generation of cytotoxic-T cells in recipient.. inhibition by suppressor T-cells. *J Exp Med* 157: 1448-1460, 1983.
- 58) Mühlradt PF and Opitz HG: Clearance of interleukin 2 from the blood of normal and T cell-depleted mice. *Eur J Immunol* 12: 983-985, 1982.
- 59) Nakayama E, Shiku H, et al: Cytotoxic T cells: Lyt phenotype and blocking of killing activity by Lyt antisera. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1977-1981, 1979.
- 60) Nakayama E, Shiku H, et al: Definition of a unique cell surface antigen of mouse leukemia RL δ 1 by cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 3486-3490, 1979.
- 61) North RJ: Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *J Exp Med* 55: 1063-1074, 1982.
- 62) North RJ: The murine antitumor immune response and its therapeutic manipulation. *Adv Immunol* 35: 89-155, 1984.
- 63) Old LJ: Cancer immunology: The search for specificity—GHA Clowes memorial lecture. *Cancer Res* 41: 361-375, 1981.
- 64) Palladino MA, Obata Y, et al: Characterization of interleukin 2-dependent cytotoxic T-cell clones: specificity, cell surface phenotype, and susceptibility to blocking by Lyt antisera. *Cancer Res* 43: 572-576, 1983.
- 65) Palladino MA, Welte K, et al: Characterization of interleukin 2(IL-2)-dependent cytotoxic T-cell clones. V. Transfer of resistance to allografts and tumor grafts requires exogenous IL-2. *Cell Immunol* 86: 299-307, 1984.
- 66) Puccetti P, Campanile GF, et al: Antilymphoma graft responses in the mouse brain: A study of T-dependent functions. *Int J Cancer* 31: 769-774, 1983.
- 67) Roehm NW, Alter BJ, et al: Lyt phenotypes of alloreactive precursor and effector cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 126: 353-358, 1981.
- 68) Rölinghoff M and Wagner H: In vitro induction tumor specific immunity: requirment for T lymphocytes and tumor growth inhibition in vivo. *Eur J Immunol* 3: 471-476, 1973.
- 69) Romani L, Fioretti MC, et al: Intracerebral adoptive immunotherapy of a murine lymphoma antigenically altered by drug treatment in vivo. *J Natl Cancer Inst* 68: 817-822, 1982.
- 70) Romani L, Bianchi R, et al: Systemic adoptive immunotherapy of a highly immunogenic murine lymphoma growing in the brain. *Int J Cancer* 31: 477-482, 1983.
- 71) Rosenberg SA and Terry WD: Passive immunotherapy of cancer in animals and man. *Adv Cancer Res* 25: 323-388, 1977.
- 72) Rosenstein M, Eberlein T, et al: In vitro growth of murine T cells. VI. Accelerated skin graft rejection caused by adoptively transferred cells expanded in T cell growth factor. *J Immunol* 127: 566-571. 1981.
- 73) Rosenstein M, Eberlein TJ, et al: Adoptive immunotherapy of established syngeneic solid tumors: role of T lymphoid subpopulations. *J Immunol* 132: 2117-2122, 1984.
- 74) Rosenstein M and Rosenberg SA: Generation of lytic and proliferative lymphoid clones to syngeneic tumor: in vitro and in vivo studies. *J Natl Cancer Inst* 72: 1161-1165, 1984.
- 75) Scheinberg LC, Edelman FL, et al: Is the brain "an immunologically privileged site"? 1. Studies based on intracerebral tumor homotransplantation and isograft transplantation to sensitized hosts. *Arch Neurol* 11: 248-264, 1964.
- 76) Scheinberg LC, Levy A, et al: Is the brain "an immunologically privileged site"? 2. Studies in

- induced host resistance to transplantable mouse glioma following irradiation of prior implants. *Arch Neurol* **13**: 283-286, 1965.
- 77) Scheinberg LC, Kotsillimbas DG, et al: Is the brain "an immunologically privileged site"? 3. Studies based on homologous skin grafts to the brain and subcutaneous tissues. *Arch Neurol* **15**: 62-67, 1966.
- 78) Shibuya N, Hochgeschwender U, et al: Immunity to transplantable nitrosourea-induced neurogenic tumors. III. Systemic adoptive transfer of immunity. *J Neuropathol Exp Neurol* **43**: 426-438, 1984.
- 79) Shiku H, Kieslow P, et al: Expression of T-cell differentiation antigens on effector cells in cell-mediated cytotoxicity in vitro: evidence for functional heterogeneity related to the surface phenotype on T cells. *J Exp Med* **141**: 227-241, 1975.
- 80) Shiku H, Takahashi T, et al: Ly phenotype of cytotoxic T cells for syngeneic tumor. *J Exp Med* **144**: 1116-1120, 1976.
- 81) Shimizu K and Shen FW: Role of different T cell sets in the rejection of syngeneic chemically induced tumors. *J Immunol* **122**: 1162-1165, 1979.
- 82) Shortman K, Wilson A, et al: Loss of specificity in cytolytic T lymphocyte clones obtained by limit dilution culture of Lyt-2⁺ T cells. *J Immunol* **132**: 584-593, 1984.
- 83) Tyler JD, Galli S, et al: Cloned Lyt-2⁺ cytolytic T lymphocytes destroy allogeneic tissue in vivo. *J Exp Med* **159**: 234-243, 1984.
- 84) Wagner H, Hardt C, et al: T-cell-derived helper factor allows in vivo induction of cytotoxic T cells in nu/nu mice. *Nature (Lond.)* **284**: 278-280, 1980.
- 85) Widmer MB and Bach FH: Antigen-driven helper cell-independent cloned cytolytic T lymphocytes. *Nature (Lond.)* **294**: 750-752, 1981.
- 86) Winn HJ: Immune mechanisms in homotransplantation. II. Quantitative assay of the immunologic activity of lymphoid cells stimulated by tumor homografts. *J Immunol* **86**: 228-239, 1961.
- 87) Yamasaki T, Handa H, et al: Specific adoptive immunotherapy with tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte clone for murine malignant gliomas. *Cancer Res* **44**: 1776-1783, 1984.