

腫瘍特異的キラーT細胞クローン株を用いた悪性グリオーマ に対する免疫療法に関する研究

京都大学医学部脳神経外科学教室（指導：半田 肇教授）

山 崎 俊 樹

〔原稿受付：昭和58年7月15日〕

A New Experimental Approach to the Specific Adoptive Immunotherapy for Malignant Gliomas

TOSHIKI YAMASAKI

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

The efficacy of tumor-specific cytotoxic T lymphocyte clone in the specific adoptive immunotherapy for a syngeneic murine malignant glioma (a methylcholanthrene-induced ependyoblastoma of C57BL/6 mouse origin, 203-glioma) was investigated. Two clones (G-CTLL 1 and 2) were established by a limiting dilution technique (0.3 cells/well in 96-well microtiter plate) with the aid of T-cell growth factor (TCGF).

TCGF was prepared and assayed as follows; 5×10^6 /ml rat or murine lymphocytes were cultured with $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ concanavalin A (Con A) in RPMI-1640 medium supplemented with 2% fetal calf serum for 48 hours. The culture supernatants (Con A sup) were concentrated by ammonium sulphate precipitation and partially purified by successive DEAE (diethylaminoethyl)-cellulose ion exchange chromatography and Sephadex G-100 gel filtration. Assays for TCGF activity were performed for a quantitative analysis using G-CTLL 1 cells.

G-CTLL 1 cell line which showed much higher cytotoxic activity against 203-glioma cells was further analyzed in vitro and in vivo. In vitro, G-CTLL 1 cells were maintained in TCGF-dependent exponential proliferative growth for over 15 months and continued to mediate extremely high cytotoxic activity against 203-glioma cells (50- to 100-fold increases over the peak cytotoxic activity of sensitized T lymphocytes in tumor-bearing mice). They also revealed a weak cytotoxic activity against RSV-M (a Schmitt-Ruppin Rous sarcoma virus-induced malignant glioma of C3H/He mouse origin) cells. However, this line had no cytotoxic activity against other syngeneic

Key words: Tumor-specific cytotoxic T lymphocyte clone, T-cell growth factor, Immune interferon, Malignant glioma, Specific adoptive immunotherapy.

索引語：腫瘍特異的キラーT細胞クローン，T細胞増殖因子，免疫インターフェロン，悪性グリオーマ，特異的免疫療法。

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

EL4 thymoma, Y-M-12 fibrosarcoma, B-16 malignant melanoma, and allogeneic P815 mastocytoma, YAC-1 T cell lymphoma and C-1300 neuroblastoma cells. Therefore, G-CTL 1 cell line seemed to exhibit a murine glioma-specific cytotoxicity. The surface phenotypes of G-CTL 1 cells by a negative selection method using a complement dependent cytotoxicity assay were determined to be Thy-1⁺, Lyt-1⁻.2⁺.3⁺ and asialo-GM1⁻, though Thy-1 antigen disappeared gradually in repeated subcultures. Their cytotoxicity was blocked by adding only anti-Lyt-2 monoclonal antibody. Therefore, these results are compatible with a theory that Lyt-2 expression on cytotoxic T lymphocyte (CTL) is correlated with the nature of the antigenic determinant or antigen recognition structure and that this molecule may play an essential role in the differentiated function of CTL.

G-CTL 1 cells were found to secrete immune interferon (IFN) by stimulating with mitogen (Con A) or tumor antigen (203-glioma or RSV-M). Immune IFN may be produced by G-CTL 1 cells in response to murine glioma-associated antigen specific stimulation. These results may suggest that in tumor-killing process G-CTL 1 cells can deliver a "one-two punch" at a local site; the death to a target cell and the local release of immune IFN, which may inhibit the tumor growth or enhance the activity of killer mechanisms at the site of a G-CTL 1-target recognition event.

Morphologically, G-CTL 1 cells appeared to be large granular lymphocytes with prominent azurophilic granules.

G-CTL 1 cells were able to recover from cryopreserved stocks and to be re-established in long-term culture retaining immunological characteristics without the loss of target specificity.

Immunobiological properties of TCGF were also characterized in murine and rat Con A sup, respectively. The major portion of TCGF activity in murine and rat Con A sup was recovered in the 50 to 80%, 40 to 80% (NH₄)₂SO₄ fraction, respectively. These activities were found in proteins of 30 to 36,000, 12 to 18,000 daltons size as estimated by gel filtration, respectively and eluted from ion exchange chromatography in a NaCl gradient on 0.15 M, 0.05 M, respectively. It was found that rat Con A sup contained TCGF activity approximately 8 times as much as murine Con A sup.

The in vivo systemic treatment of intracranial tumor-bearing mice is a far better test of the therapeutic potential of G-CTL 1 cell line, though some immunotherapy protocols have utilized a Winn-type neutralization assay (the admixture of G-CTL 1 and tumor cells in vitro prior to the in vivo adoptive transfer). In the adoptive immunotherapy study, all 24 mice except one have survived for over 15 weeks when transferred 2 or 5 × 10⁷ G-CTL 1 cells intravenously by the 7th day after the intracranial tumor cell inoculation. A standard model of intracranial tumor-bearing mice was made by inoculating intracranially with 5 × 10⁵ 203-glioma cells. All mice died with a median survival time (MST) of 3.2 weeks. The considerable therapeutic effects were largely dependent on dose and time of intravenous administration. On the contrary, the infusion of sensitized splenic T lymphocytes from tumor-bearing donors resulted in a decrease of MST, suggesting strongly that suppressor T cells or their precursor cells exist and regulate the immune responses in a tumor-bearing host.

This new experimental approach to the specific adoptive immunotherapy with tumor-specific

cytotoxic T lymphocyte clone and TCGF may be particularly useful for malignant gliomas because gliomas do not usually metastasize to other organs. Moreover, it is expected that modifications of these techniques may be applicable to the therapy of human malignant gliomas.

I. はじめに

脳腫瘍の免疫監視機構に関して、従来より脳は“a partially immunologically privileged site”であるということが指摘^{1,7,30,46,51,59,60,61,62,72)}されている。われわれも、マウス悪性グリオーマ (203-glioma) のモデル系においてキラーT細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) を中心としたT細胞サブセットの免疫応答の解析から脳腫瘍の免疫学的特殊性の一面を明らかにし得た⁷³⁾。すなわち、中枢神経系の特殊な解剖学的構築 (脳血液関門の存在およびリンパ系路の欠如) に加え、腫瘍増殖に伴う頭蓋内圧亢進 (increased intracranial pressure, IICP) の出現により、とくにキラーT前駆細胞 (pre-CTL) の誘導ならびに CTL の効果発現などの免疫応答が不完全であることがわかった。しかしながら、脳腫瘍系においても腫瘍特異的 CTL が不十分ながら誘導され、しかも一過性ではあるが抗腫瘍性を発揮していることを報告した⁷³⁾。

そこで、腫瘍特異的 CTL の単クローン化と量産化が可能となれば、それらを応用した特異的免疫療法が従来の非特異的免疫療法にくわえて悪性脳腫瘍に対する補助療法のひとつとして大いに期待されるものと考えられる。

一方、近年の著しい免疫学の技術的進展の中にあつて、T細胞増殖因子 (T-cell growth factor, TCGF) により機能を保持したままT細胞 (キラー、ヘルパーあるいはサブプレッサーT細胞など) の長期培養化ならびにそのクローン株の樹立が可能となってきた^{2,9,23,24,25,26,27,40,45,55,57,63,66,73)}。

従つて、われわれは悪性グリオーマに対する免疫療法のひとつとして、TCGFによりグリオーマ特異的 CTL クローン株 (glioma-specific CTL clone, G-CTL) を樹立し、しかも量産化した後、再びそれらを脳局所 (腫瘍内) に移入する特異的免疫療法 (specific adoptive immunotherapy) の確立を目的にマウスモデル実験を試みた。その結果、TCGFにより樹立したマウス G-CTL は、マウス脳腫瘍モデルに対し腫瘍中和試験 (Winn-type neutralization assay) および移入試験 (systemic adoptive transfer assay) から判

定すると *in vivo* における抗腫瘍性を十分に有していた。すなわち、マウス G-CTL を用いた特異的免疫療法の有用性が確かめられたので、G-CTL の種々の免疫生物学的性状およびその *in vivo* 投与における問題点、ならびに TCGF の調整法およびその物理化学的性状をも含め報告する。さらに、以上の基礎実験にもとづいてヒト悪性グリオーマに対するヒト G-CTL およびヒト TCGF を用いた特異的免疫療法への展望に関しても考察を加えた。

II. 研究材料および方法

1. 実験動物および腫瘍細胞

京都大学医学部動物センターより供給された6~8週令の C57BL/6 雄マウスおよび10~12週令の Wistar 系雌ラットを用いた。

実験腫瘍は、20-methylcholanthrene で誘発した C57BL/6 マウス由来の可移植性神経膠芽腫株 (203-glioma) を用いた³³⁾。われわれは、同系マウス皮下へ移植継代されてきた110代目の皮下腫瘍より10%非動化牛胎児血清 (Fetal calf serum, FCS, Grand Island, N.Y.) 添加 Dulbecco's modified MEM (日水製薬) (ストレプトマイシン 50 mg/m² 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) で樹立した継代培養株を用いた⁴⁹⁾。

一部の実験では、同系腫瘍の EL4 (a benzopyrene-induced thymoma), YM-12 (a methylcholanthrene-induced fibrosarcoma), B-16 (a spontaneous malignant melanoma) および異系腫瘍の P815 (a methylcholanthrene-induced mastocytoma of DBA/2 mouse origin), YAC-1 (a moloney leukemia virus-induced T cell lymphoma of A/Sn mouse origin), C-1300 (a spontaneous neuroblastoma of A/J Ax mouse origin), RSV-M (a Schmitt-Ruppin Rous sarcoma virus-induced malignant glioma of C3H/He mouse origin) を用いた。

なお YM-12, B-16, C-1300, RSV-M は D'MEM 完全培地で、EL4, P815, YAC-1 は RPMI-1640 (日水製薬) 完全培地で継代維持している。

2. 担脳腫瘍モデルの作製

培養 203-glioma 細胞を 0.1% trypsin および 0.01% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 添加 phosphate-buffered saline (PBS, NaCl: 8.0 g/l, Na_2HPO_4 : 1.15 g/l, KCl: 0.2 g/l, KH_2PO_4 : 0.2 g/l in distilled water) で浮遊化し MEM 培養液で洗浄後、 5×10^5 個/ $10 \mu\text{l}$ の生細胞を microinjector (Hamilton, 500 μl 型) および矢追針を用い右大脳半球内に半定位的に移植した。この場合、腫瘍生着率は 100% でマウスの平均寿命 (median survival time, MST, 50% の動物が死亡するまでの期間) は 3.2 週であった⁷³⁾。

3. i) **TCGF の調整** マウス脾細胞あるいはラット脾および腸間膜リンパ節細胞 $5 \times 10^6/\text{ml}$ を $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ concanavalin A (Con A, Pharmacia, Sweden) および 2% FCS 添加 RPMI-1640 培地で 48 時間培養した。遠心 (10,000 rpm, 20 分) の後、培養上清 (Con A sup) を得た。Con A sup 中から Con A を除くために次の操作を行なった。ラット Con A sup を 0.1 mM MgCl_2 および 0.1 mM MnCl_2 を含む 20 mM PBS (pH 7.4) で平衡化した Sephadex G-50 カラムにかけ、室温で 2 時間放置した後、溶出させた。これを Con A-free sup と呼ぶことにする。

ii) **TCGF の部分精製**：精製操作はすべて 4°C でおこなった。まず、第一段階として、マウスおよびラット Con A sup を硫酸分画した。予備的に Con A sup 5 ml に各々固形硫酸を加え 0% から 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100% 飽和までの 16 段階の分画をおこなった。一晚放置後、生じた沈殿を遠心 (10,000 rpm, 20 分, 4°C) により集め、PBS に溶かした後、透析をおこなった。第二段階として、硫酸分画により得た活性画分を 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4, NaPB) に対し透析をおこなった後、あらかじめ同緩衝液で平衡化した DEAE (diethylaminoethyl)-cellulose カラム (径 2.3 cm × 長さ 16.0 cm) に吸着させた。カラムを同緩衝液で洗浄した後、吸着物を NaCl の直線濃度勾配 (0.01–0.5 M) によって溶出した。各フラクション (7.4 ml) の NaCl 濃度は、電気伝導度を測定し、あらかじめ作成した検量線より求めた。第三段階として、第二段階の活性画分をポリエチレングリコール (#PEG 20,000) により濃縮し、PBS に対し透析した後、Sephadex G-100 カラム (径 3.2 cm × 長さ 96.0 cm) のゲル濾過をおこなった。分子量のマーカーとしては、bovine serum albumin (BSA, m.w. 68,000), ovalbumin (OVA, m.w. 44,000), myoglobin (MYO, m.w. 18,000)

を用いた。

iii) **TCGF の活性測定**：各段階で得られた試料は、PBS に対し透析しミリポアフィルター (孔径 $0.45 \mu\text{m}$) に通した後、TCGF 活性の測定に用いた。

TCGF の活性は、後述の TCGF 依存性 G-CTLL 1 を用いた proliferation assay で測定した。すなわち、G-CTLL 1 細胞をあらかじめ 24 時間前に培地交換し、TCGF 活性の測定時間に MEM 培養液で洗浄して TCGF を除去した後、96 穴平底マイクロプレート (Nunc, Denmark) に $5 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ 分注した。各プレートに倍数希釈した (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) sample $100 \mu\text{l}$ を加え、24 時間培養後、G-CTLL 1 細胞の生存細胞数を trypan blue dye exclusion method にて算定し倍数希釈曲線を作成した。その倍数希釈曲線から 1/2 希釈時の 50% 生存細胞数に必要な濃度希釈の逆数を求め、力価 (U/ml) を定義した。なお、G-CTLL 1 は TCGF 非存在下では 24 時間以内にはほぼ 100% 死滅する。

4. マウス G-CTLL の樹立

203-glioma の担腫瘍動物で CTL 活性がピークを示す皮下移植 2 週目の所属リンパ節 T 細胞⁷³⁾ (Tc) $1 \times 10^6/0.5 \text{ ml}$ を responder とし、皮下移植 6 週目に 850 rad 照射 (in vivo) した 2 日後のマウス脾細胞 $5 \times 10^4/0.5 \text{ ml}$ を antigen presenting cell とし、平底 24 穴プレートで培養開始した。3 日目に 30% Con A-free sup 1 ml を添加し、6 日目に他の平底 24 穴プレートに移し替え、30% Con A-free sup と antigen presenting cell ($2 \times 10^5/\text{ml}$) を添加し 3~7 日間培養した。203-glioma 細胞に対し CTL 活性を有する細胞を分離し TCGF 依存性細胞株 (一次クローン) を得た。さらに、希釈限界法 (0.3 cells/well in 96-well microtiter plate) により一次クローンのモノクローン化 (二次クローン; G-CTLL) をおこなった。すなわち、30% CM (conditioned medium; Con A sup を 30% 含む RPMI-1640 完全培地) ならびに antigen presenting cell ($2 \times 10^5/\text{ml}$) とともに $100 \mu\text{l}$ で平底 96 穴マイクロプレートを用い培養開始した。4 日目、8 日目に 30% CM を $100 \mu\text{l}$ 添加し増殖してくるクローンを 12~16 日目に pick up し、以後平底 24 穴プレートにて 30% CM 存在下に継代培養をおこなった。

5. 腫瘍細胞障害性試験

203-glioma をはじめ YM-12, B-16, C-1300 および RSV-M 細胞は、トリプシンと EDTA 処理をおこなわなければ浮遊化できず、その処理によって腫瘍

抗原性が失なわれるため ^{51}Cr release 法で測定するのは適当でない。従って、Takasugi and Klein らの方法⁶⁹⁾を一部改変した microcytotoxicity assay を用いた。すなわち、assay 時間内の腫瘍増殖を停止させ、かつ腫瘍抗原性を保持させるために Mitomycin-C 処理 ($50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$, 45分間)をおこなった target cell と G-CTL (effector to target cell, E:T, ratio=2:1, 10:1) の18時間混合培養後に生存する target cell を trypan blue dye exclusion method で求め、次の算式から CTL 活性を測定した。

$$\text{CTL activity (\%)} = \frac{\text{surviving target cells obtained after incubation with G-CTL cells}}{(1 - \frac{\text{surviving target cells obtained after incubation with medium alone}}{\text{surviving target cells obtained after incubation with G-CTL cells}}) \times 100}$$

なお、G-CTL は TCGF 非存在下では約12時間で90%、18時間では98%が死滅するので target cell count には殆んど影響がなかった。

6. 表面マーカーの検索

G-CTL の膜抗原は、a) 抗 Thy-1, b) 抗 Lyt-1, c) 抗 Lyt-2, (Becton Dickinson Sunnyvale, CA), d) 抗 asialo-GM₁ (和光純薬), の各モノクローナル抗体を用い、補体依存性試験による two-step cytotoxicity assay で判定した。すなわち、G-CTL $10^6/\text{ml}$ を各抗体で 4°C , 30分間処理した後、補体 (乾燥補体、極東製品) を加え 37°C , 45分間培養した。2回洗浄後、trypan blue dye exclusion method にて各抗体処理後における G-CTL の生存細胞数を求め、次の算式より各々の cytotoxic index を表示した。

$$\text{Cytotoxic index (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A : the percentage of viable G-CTL cells after lysis by antibody plus complement

B : the percentage of viable G-CTL cells after treatment with normal mouse serum plus complement

なお、抗 Lyt-1 および Lyt-2 抗体を用いた検索の場合、二次抗体 (rabbit anti-rat immunoglobulin) による処理 (4°C , 30分間)を補体処理の前に追加した。使用するモノクローナル抗体の力価は、各々 a) $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 10^7 脾細胞, b) および c) $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 10^6 脾細胞, d) $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 10^6 ノードマウス脾細胞、であり補体および二次抗体はいずれも細胞障害性を示さずかつ活性が保持される濃度として各々10倍、100倍希釈のものをを用いた。

7. インターフェロン (IFN) の活性測定

IFN 活性は、96穴平底マイクロプレートに培養したマウス L 細胞に対する水疱性口炎ウイルス (vesicular stomatitis virus, VSV) の細胞毒性法 (conventional cytopathic effect, CPE, inhibition assay) により測定した⁸⁾。すなわち、L 細胞 $3 \times 10^4/\text{well}$ を96穴平底マイクロプレートに分注し、段階希釈した試料を $100\text{ }\mu\text{l}$ 加え 37°C , 24時間培養した後、 100 TcID_{50} の VSV $100\text{ }\mu\text{l}$ を加え L 細胞に感染させた。さらに24時間培養した後、VSV の細胞変性効果 (CPE) を顕微鏡下にて判定し、CPE を50%に抑制するのに要する希釈濃度の逆数を力価 (U/ml) と定義した。

8. IFN の中和試験

抗マウス免疫型 (γ -type) IFN 抗体は、ラビットをマウス免疫型 IFN で感作して得られた抗血清 (rabbit anti-mouse γ -IFN) を、抗マウス α -, β -type IFN 抗体は、ヒツジをマウス α -, β -type IFN で感作して得られた抗血清 (sheep anti-mouse α -, β -IFN) を用いた。

96穴平底マイクロプレートに各種抗血清 (抗 IFN 抗体) を2段階希釈しておき、同量の試料を加えた後、 37°C , 1時間反応させた。その後、反応液をあらかじめ L 細胞 $3 \times 10^4/\text{well}$ を分注しておいた平底96穴マイクロプレートの well 中に移行させた。 37°C , 24時間培養後、 100 TcID_{50} の VSV を L 細胞に感染させ、さらに 37°C , 24時間培養した。VSV の CPE を顕微鏡下にて判定し、CPE を50%にする抗血清の希釈濃度の逆数を中和抗体価として表示した。

9. IFN の pH 2.0 処理試験

50 mM KCl を 1 N HCl で pH 2.0 に調整した緩衝液に対し、試料を透析 (4°C , 24時間) した後、続いて 20 mM PBS (pH 7.4) に対し透析 (4°C , 24時間) した。対照は、 20 mM PBS (pH 7.4) に対し透析 (4°C , 48時間) した。

上記、pH 2.0 処理試験をおこなった後、IFN 活性を測定した。

10. 担脳腫瘍動物に対する G-CTL 1 の抗腫瘍効果

G-CTL 1 の in vivo における抗腫瘍効果は次の2つの試験から判定した。

i) 腫瘍中和試験 (Winn-type neutralization assay)

203-glioma 細胞 5×10^5 個の頭蓋内移植に際し、G-CTL 1 1×10^6 または 5×10^6 個 (すなわち、E:T ratio=2:1 または 10:1) を混合して移植した担脳腫瘍動物の生存日数を観察し、MST, TDR (tumor

death rate at 8 weeks, 腫瘍移植後8週までに死亡する比率), D/T (number of mice died after tumor cell inoculation/total number of mice inoculated intracranially, 腫瘍移植後死亡したマウス数/全腫瘍移植マウス数) を求めた. なお, MST は8週までに死亡したマウスの生存日数より算出した.

- ii) 移入試験 (systemic adoptive transfer assay)
 - a) 移入する G-CTLL 1 の有効投与数を見るため, 203-glioma 細胞 5×10^5 個を頭蓋内に移植した担脳腫瘍動物に対し, 移植後7日目に G-CTLL 1 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 または 5×10^7 個/1.0 ml を尾静脈より静注し, 同様に MST, TDR, D/T を求めた.
 - b) 移入する G-CTLL 1 の有効投与時期を見るため, 203-glioma 細胞 5×10^5 個を頭蓋内に移植した担脳腫瘍動物に対し, 種々の時期に G-CTLL 1 1×10^7 個/1.0 ml を静注し, 同様に MST, TDR, D/T を求めた.
 - c) 頭蓋内移植腫瘍細胞数と G-CTLL 1 の移入効果の関係をみるため, 203-glioma 細胞 2.5×10^5 , 5×10^5 または 1×10^6 個を頭蓋内に移植した担脳腫瘍動物

Table 1. Cytotoxic activity of G-CTLL cells against 203-glioma cells

Effector cells	Cytotoxic activity (% lysis)	
	E:T=2:1	E:T=10:1
Primary clone		
a	67.9**	87.9**
b	47.7**	67.7**
c	46.4*	56.6*
G-CTLL		
1	58.2*	82.6**
2	44.6*	68.4**
3	10.8	12.5
4	8.0	12.1
5	12.0	8.1

G-CTLL 1 and 2 cells exhibited a significant cytotoxic activity against 203-glioma cells, though 5 clones were obtained from primary clone "a" which possessed much more % lysis than other clones "b" and "c". Values are statistically significant

(* $p < 0.01$, ** $p < 0.005$).

TCGF: T-cell growth factor.
G-CTLL: glioma-specific cytotoxic T lymphocyte clone.
E:T: effector to target cell ratio.

物に対し, 移植後7日目に G-CTLL 1 2×10^7 個/1.0 ml を静注し, 同様に MST, TDR, D/T を求めた.

III. 結 果

1. マウス G-CTLL の樹立

分離された3株の一次クローンのうち 203-glioma 細胞に対し CTL 活性を最も強度に示した "a" をクローニングした結果, 5 株の二次クローンが得られた (cloning efficiency: 5.2%). これら5株の二次クローンはいずれも TCGF 依存性に exponential に増殖したが, 203-glioma 細胞に対し CTL 活性を示したものは2株 (G-CTLL 1, 2) であった (Table 1). それらのうち, より CTL 活性の強い G-CTLL 1 について免疫生物学的性状ならびに in vivo における抗腫瘍効果を検索した.

2. G-CTLL 1 の免疫生物学的性状

i) TCGF 依存性

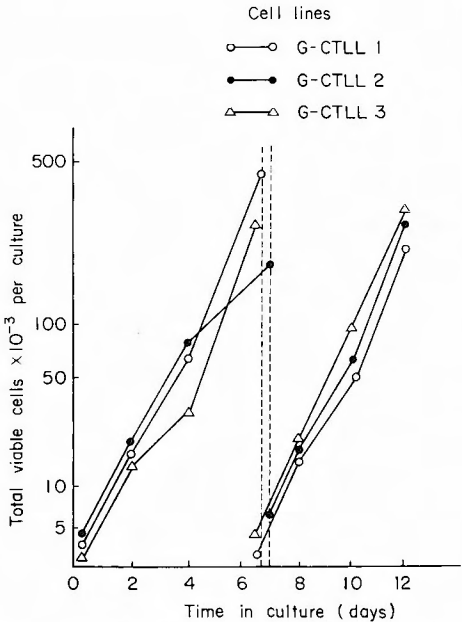


Fig. 1. Growth curves of G-CTLL cells in vitro. When seeded at a concentration of 5×10^3 cells per ml, G-CTLL 1, 2 and 3 cells reach a saturation density of approximately 3×10^5 cells per ml after 6 or 7 days in culture, demonstrating a doubling time of approximately 24 hours. The proliferative growth is totally dependent on the presence of TCGF. G-CTLL: glioma-specific cytotoxic T lymphocyte clone.
TCGF: T-cell growth factor.

G-CTLL1 は, Con A sup 中の TCGF に依存性に約24時間の倍加時間で増殖した (Fig. 1).

G-CTLL1 を用いマウスおよびラットの Con A sup 中に含まれる TCGF の物理化学的性質を比較すると, 各々硫酸分画では50~80%, 40~80%で飽和し (Table 2), DEAE-cellulose イオン交換クロマトグラ

フィーでは 150 mM, 50 mM NaCl の位置に溶出され (Fig. 2 a, b), Sephadex G-100 ゲル濾過法では分子量 3.3万, 1.5万の位置に溶出された (Fig. 3 a, b). また, Con A sup 中に含まれる TCGF の力価は, ラットのそれがマウスのその約 8 倍高値を示した (Fig. 4).

ii) TCGF 活性

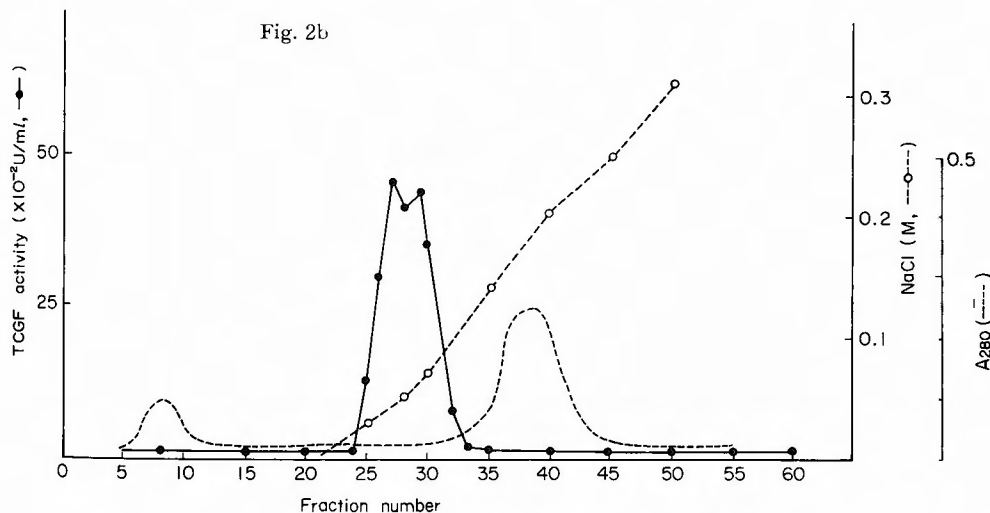
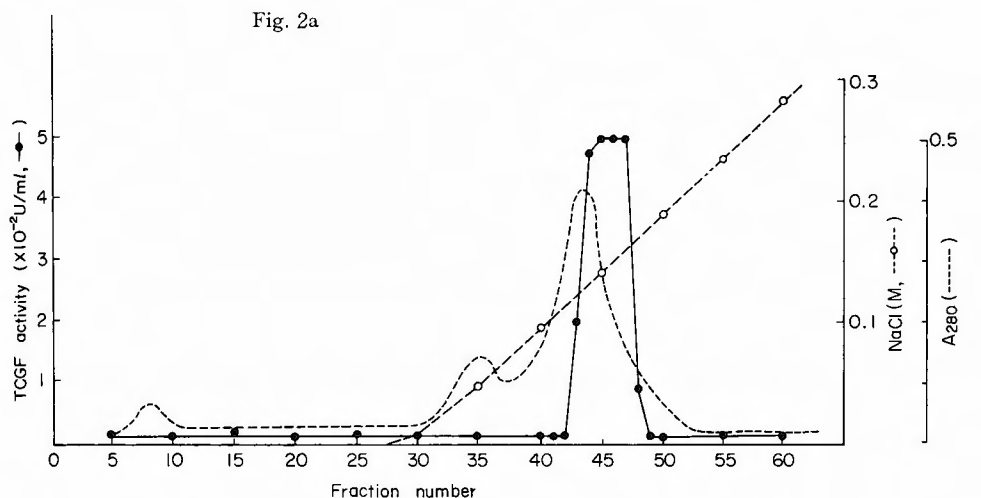


Fig. 2. DEAE-cellulose ion exchange chromatography of murine (a) or rat (b) Con A sup. The 50 to 80%, or 40 to 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitate from 200ml murine or rat Con A sup was dissolved in 5ml 20mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and dialyzed twice against 100 volumes of the same buffer before fractionation, respectively. The samples were applied to a DEAE (diethylaminoethyl)-cellulose column equilibrated in the same buffer, respectively. A gradient from 0.01 to 0.5 M NaCl was used for elution. The conductivity of each fraction was measured to determine the ionic gradient. The fractions were subsequently assayed for TCGF activity (—●—). Each fraction (7.4 ml) was examined for the optical density at 280 Å (---) and the NaCl concentration (---○---).
TCGF: T-cell growth factor.
Con A sup: culture supernatant stimulated by Con A.
Con A: concanavalin A.

G-CTLL 1 の 203-glioma 細胞に対する CTL 活性は 5.56 lytic units (LU)/ 10^6 細胞であり, Tc のそれは 0.13 LU/ 10^6 細胞であった (Fig. 5). すなわち, G-CTLL 1 は 203-glioma 細胞に対し強度の CTL 活性を示した.

iii) 腫瘍特異性

8 株の腫瘍細胞株 (203-glioma, EL4, YM-12, B-16,

P 815, YAC-1, C-1300, RSV-M) に対する G-CTLL 1 の CTL 活性を測定することにより, G-CTLL 1 の腫瘍特異性を検索した. G-CTLL 1 は 203-glioma 細胞に対し強度の CTL 活性を保持しており, RSV-M に対しても軽度の CTL 活性を有していた (Table 3). 故に, G-CTLL 1 は 203-glioma および RSV-M 細胞に対し cross-reactivity を示し, マウスグリオーマに対

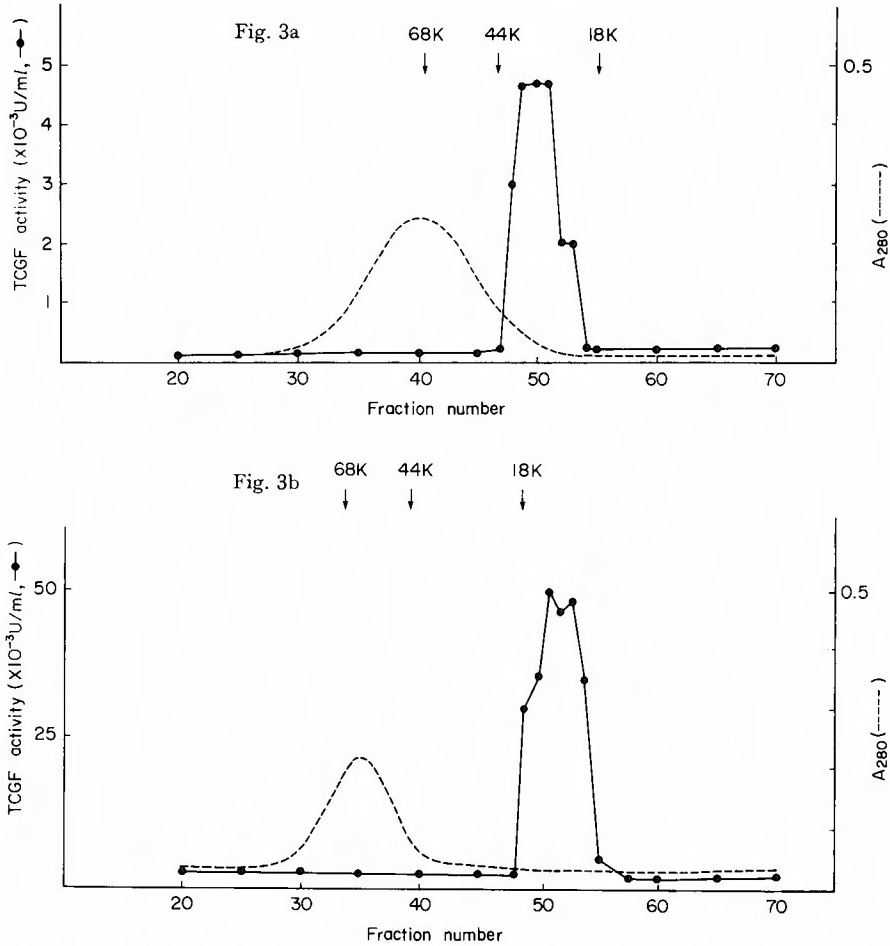


Fig. 3. Sephadex G-100 gel filtration of murine (a) or rat (b) Con A sup

The active fractions from DEAE-cellulose ion exchange column containing TCGF activity (fraction 43 to 48 in murine Con A sup, or fraction 25 to 32 in rat Con A sup) were pooled, concentrated by polyethyleneglycol (PEG #20,000) to 10 ml/volume, and dialyzed twice against 100 volumes of 20 mM phosphate-buffered saline (pH 7.4) before fractionation, respectively. The samples were then applied to a Sephadex G-100 column equilibrated in the same buffer, respectively. The column was calibrated with the following m.w. (molecular weight) standards: bovine serum albumin (68,000 m.v.), ovalbumin (44,000 m.w.) and myoglobin (18,000 m.v.). The fractions were subsequently assayed for TCGF activity (—●—). Each fraction (7.4 ml) was examined for the optical density at 280 Å (-----).

TCGF: T-cell growth factor.

Con A sup: culture supernatant stimulated by Con A.

Con A: concanavalin A.

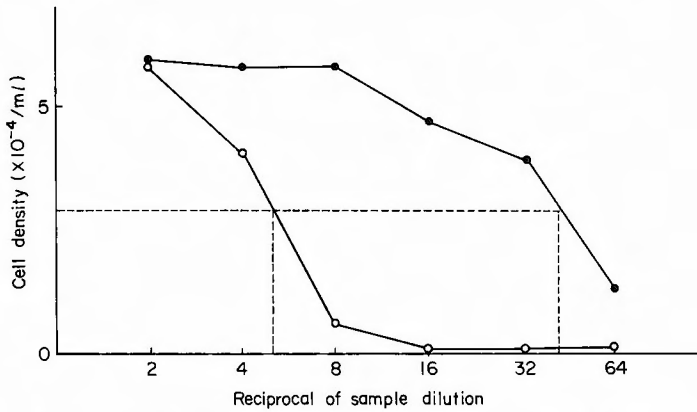


Fig. 4. Relative capacity of Con A sup to support proliferation of long-term cultured G-CTLL 1 cells
 Rat Con A sup (—●—) contained approximately 40 U/ml of TCGF activity. On the other hand, murine Con A sup (—○—) contained approximately 5 U/ml.
 G-CTLL: glioma-specific cytotoxic T lymphocyte clone.
 TCGF: T-cell growth factor. Con A sup: culture supernatant stimulated by Con A. Con A: concanavalin A.

し腫瘍特異性を有しているものと思われる。

iv) 表面マーカー

G-CTLL 1 の膜抗原を補体依存性試験により、培養期間中経時的に観測した。Thy-1 抗原は培養35日目に陽性であったが、56日目以降では陰性であった。Lyt-2 抗原は陽性を保持している。一方、Lyt-1 および

asialo-GM₁ 抗原はいずれも陰性であった (Table 4)。

v) 抗 Lyt-2 抗体の CTL 活性阻止作用

培養35日目に、G-CTLL 1 を抗 Lyt-2 抗体単独で

Table 2. Separation of TCGF activity from murine and rat Con A sup by precipitation in ammonium sulphate

Concentration of (NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	Biologic activity of TCGF (U/ml)	
	mouse	rat
0 - 40	<0	<0
40 - 45	<0	4
45 - 50	<0	9
50 - 55	2	20
55 - 80	4	36
80 <	5	40

Sequential precipitation with increasing concentration of (NH₄)₂SO₄ precipitation was performed at 4°C. The pellet of material recovered by centrifugation of each step was dissolved in 5.0ml of 20 mM phosphate-buffered saline (ph 7.4) and dialyzed twice against 100 volumes of the same buffer. Each sample was then assayed in serial 2-fold dilutions for TCGF activity. The biologic activity is expressed in units as described in MATERIALS AND METHODS.
 TCGF: T-cell growth factor.
 Con A sup: culture supernatant stimulated by Con A.
 Con A: concanavalin A.

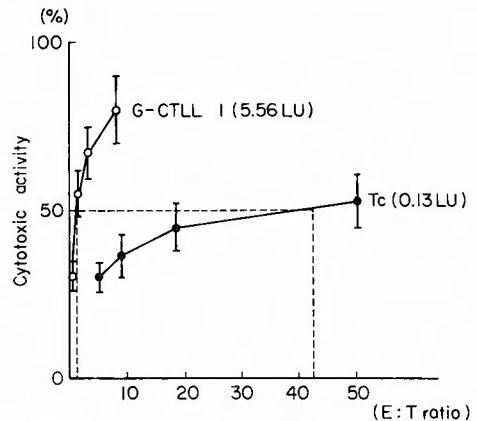


Fig. 5. Comparison of cytotoxic activity between G-CTLL 1 and Tc cells

On Day 35 after starting continuous culture, G-CTLL 1 cells showed 5.56 LU/10⁶ cells up to 50- to 100-fold increases of Tc cells which showed 0.13 LU/10⁶ cells. Regional lymph node T lymphocytes on Day 14 after tumor cell inoculation are referred to as Tc cells, which exhibit a peak cytotoxic activity in tumor-bearing mice⁷³⁾.

Lytic unit (LU) is defined as the number of effector cells required for 50% lysis of 203-glioma cells within 24 hours.

G-CTLL: glioma-specific cytotoxic T lymphocyte clone.

Table 3. Target specificity of G-CTLL 1 cells

Tumor cell lines		Cytotoxic activity (% lysis)					
		Day 56		Day 210		Day 360	
		E:T=2:1	E:T=10:1	E:T=2:1	E:T=10:1	E:T=2:1	E:T=10:1
203-glioma	(H-2 ^b)	63.2**	83.2**	60.6**	86.2**	62.4**	80.8**
B-16	(H-2 ^b)	ND	4.8	ND	2.6	ND	4.6
YM-12	(H-2 ^b)	ND	6.2	ND	3.4	ND	3.6
EL-4	(H-2 ^b)	ND	6.8	ND	3.8	ND	5.8
RSV-M	(H-2 ^a)	ND	ND	ND	ND	18.8*	28.6*
C-1300	(H-2 ^k)	ND	ND	ND	ND	ND	3.3
P815	(H-2 ^d)	ND	3.2	ND	3.2	ND	2.2
YAC-1	(H-2 ^a)	ND	2.6	ND	2.8	ND	1.8

On Day 56, 210 and 360 after starting continuous culture, G-CTLL 1 cells exhibited a significant cytotoxic activity against syngeneic 203-glioma cells and a mild cytotoxic activity against allogeneic RSV-M glioma cells, but there was no significant cytotoxic activity against a panel of other 3 syngeneic tumor cell lines, B-16, YM-12 and EL4, and 3 allogeneic tumor cell lines, C-1300, P815 and YAC-1 (**p<0.005, *p<0.05). G-CTLL 1 cells appeared to continue to mediate a murine glioma-specific cytotoxicity. G-CTLL, glioma-specific cytotoxic T lymphocyte clone. E:T: effector to target cell ratio. ND: not done.

処理した後、203-glioma 細胞に対する CTL 活性を測定すると、抗 Lyt-2 抗体の濃度に依存して CTL 活性が阻止された (Fig. 6). 培養300日目でも抗 Lyt-2 抗体の CTL 活性阻止作用がみられた。

vi) IFN 産生能
G-CTLL 1 は、少量の IFN (10⁶ U/ml で 26 U/ml, 3×10⁵ U/ml で 8 U/ml) を培養液中に自然放出するが、mitogen または tumor antigen 刺激で G-CTLL 1 の

IFN 産生が増強されることがわかった (Table 5 A, B). すなわち、a) G-CTLL 1 (10⁶/ml) を Con A (2, 5, 10 μg/ml) で 24時間刺激すると、その培養上清中に IFN 活性 (各々 1500, 5600, 5000 U/ml) がみられた。次に、G-CTLL 1 (3×10⁵/ml) を一定にして Con A (5 μg/ml) および下記の tumor antigen で刺激し IFN の産生量を測定した。Con A の場合、150 U/ml であった。b) tumor antigen の場合、G-CTLL 1 (3×10⁵/ml) を種々の腫瘍細胞とともに (E:T ratio=2:1) 24 時間混合培養した後、各々の培養上清中の IFN 活性を測定すると、203-glioma および RSV-M の場合に IFN 活性が各々 140, 156 U/ml と高値を示した。これは、G-CTLL 1 が 203-glioma と RSV-M に共通したマウスグリオーマ関連抗原に関与して IFN を産生していることを示唆しているものと思われる。

a), b) で産出された IFN 活性は、抗マウス γ-IFN 抗体中和試験および pH 2.0 処理試験の後に消失したので γ-type であることがわかった⁵²⁾。

vii) 形態学的同定
May-Gruenwald-Giemsa 染色法を用いた。形態は大形で好塩基性の原形質内に多数のアズール顆粒を有し、核は楕円形で小核仁を有した large granular lymphocyte に類似した細胞と思われた (Fig. 7).

viii) 凍結保存性
凍結保存による G-CTLL 1 の増殖能、TCGF 依存性、

Table 4. Surface markers of G-CTLL 1 cells

Treatment	Viable G-CTLL 1 cells (%)		
	Day 35	Day 56	Day 180
none	77.9	78.4	80.4
complement	78.0	76.2	78.6
Thy-1	3.5*	58.3	76.2
Lyt-1	74.7	76.3	83.8
Lyt-2	4.0*	6.2*	5.2*
asialo-GM ₁	78.6	73.2	76.6

Surface phenotypes of G-CTLL 1 cells were evaluated by a negative selection method using a complement-dependent cytotoxicity assay. On Day 35 after starting continuous culture, they showed Thy-1⁺, Lyt-1⁺, 2⁺, 3⁺ and asialo-GM₁⁺. On Day 56 and 180, however, Thy-1 antigen became negative. G-CTLL: glioma-specific cytotoxic T lymphocyte clone. Values are statistically significant (*p<0.005).

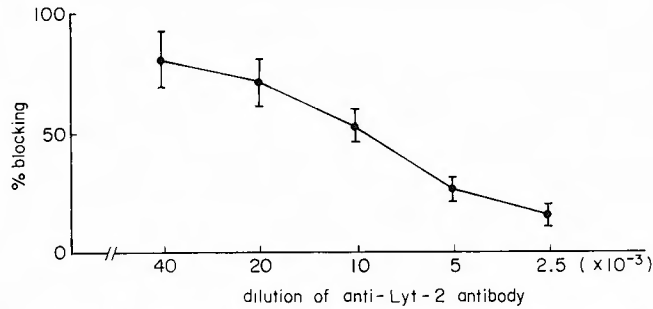


Fig. 6. *Blocking of target cell lysis by anti-Lyt 2 monoclonal antibodies in the absence of complement*

% blocking of cytotoxicity by anti-Lyt-2 monoclonal antibodies is calculated as $100 \times (1 - \% \text{ cytotoxicity in the presence of antibody} / \% \text{ cytotoxicity in the absence of antibody})$.

% blocking is represented in reciprocal dilution curve.

CTL 活性、腫瘍特異性および免疫 IFN 産生能は維持されている。

3. G-CTLL 1 の in vivo における抗腫瘍効果

i) 腫瘍中和試験 (Winn-type neutralization assay)

E:T ratio=10:1 の場合、全例が15週以上生存している。E:T ratio=2:1 の場合では、MST, TDR, D T は各々5.6週, 100%, 5/5であった (Table 6)。いずれの場合でも延命効果がみられた。

ii) 移入試験 (systemic adoptive transfer assay)

a) 203-glioma 細胞 5×10^5 個を移植した担脳腫瘍マウスに対し7日後に G-CTLL 1 を静注した場合 (Table 7), 5×10^7 または 2×10^7 個では1例 (10週目に死亡) を除き全例15週以上生存している。 1×10^7 または 5×10^6 個では各々 MST は6.1, 5.9週, TDR はともに50%, D T は4/8, 5/10であった。すなわち、 5×10^6 個以上であれば延命効果がみられた。しかしながら、 1×10^6 個では MST, TDR, D T は各々3.8週, 100%, 8/8であり延命効果はみられなかった。

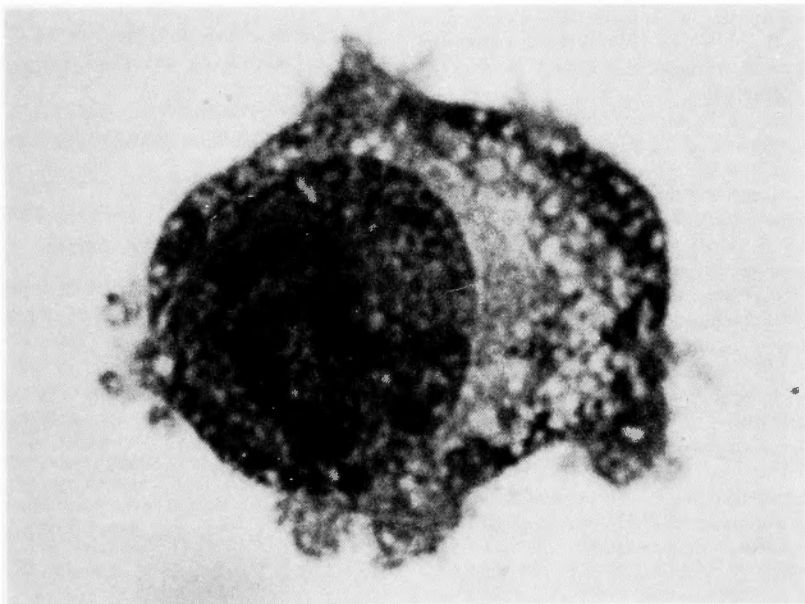


Fig. 7. *A May-Gruenwald-Giemsa stained cytocentrifuged preparation of G-CTLL 1 cells after 16 weeks of continuous culture in vitro (Magnification, $\times 1,200$)*
G-CTLL: glioma-specific cytotoxic T lymphocyte clone.

Table 5. *Production of immune IFN by G-CTLL 1 cells*

(A)	Con A ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	IFN activity (U/ml)	
		$10^6/\text{ml}$	$3 \times 10^5/\text{ml}$
	0	26	8
	2	1500	ND
	5	5600	150*
	10	5000	ND

(B)	Tumor cell lines	IFN activity (U/ml)	
		E:T=0:1	E:T=2:1
	203-glioma (H-2 ^b)	<2	140*
	B-16 (H-2 ^b)	<2	33
	YM-12 (H-2 ^b)	<2	10
	EL4 (H-2 ^b)	<2	<2
	RSV-M (H-2 ^a)	<2	156*
	C-1300 (H-2 ^k)	<2	4
	P815 (H-2 ^d)	<2	<2
	YAC-1 (H-2 ^a)	<2	32

Immune IFN was produced by stimulating G-CTLL 1 cells with (A) mitogen (concanavalin A, Con A) or (B) tumor antigen. When $10^6/\text{ml}$ G-CTLL 1 cells were cultured with various concentrations of Con A, the maximum activity of immune IFN was found to be released at $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ Con A. When $3 \times 10^5/\text{ml}$ G-CTLL 1 cells were cultured with Con A ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$) or tumor cells (203-glioma, RSV-M) at E:T ratio of 2:1, a significant amount of immune IFN was produced (* $p < 0.01$). Therefore, G-CTLL 1 cell line appeared to secrete immune IFN in response to murine glioma-associated antigen-specific stimulation.

G-CTLL: glioma-specific cytotoxic T lymphocyte clone.

E:T: effector to target cell ratio. ND: not done.

203-glioma: a methylcholanthrene-induced ependymoblastoma of C57BL/6 mouse origin.

B-16: a spontaneous malignant melanoma of C57BL/6 mouse origin.

YM-12: a methylcholanthrene-induced fibrosarcoma of C57BL/6 mouse origin.

EL4: a benzopyrene-induced thymoma of C57BL/6 mouse origin.

RSV-M: a Schmitt-Ruppin Rous sarcoma virus-induced malignant glioma of C3H/He mouse origin.

C-1300: a spontaneous neuroblastoma of A/J Ax mouse origin.

P815: a methylcholanthrene-induced mastocytoma of DBA/2J mouse origin.

YAC-1: a moloney leukemia virus-induced T cell lymphoma of A/Sn mouse origin.

Table 6. *Winn-type neutralization assay*

G-CTLL 1: Tumor ratio (i.e.: 5×10^7)	Survival and Mortality		
	MST	TDR	D/T
10:1	15<	0	0/6
2:1	5.6*	100	5/5
0:1	3.2	100	12/12

A mixture of G-CTLL 1 and 5×10^5 203-glioma cells at G-CTLL 1: tumor cell ratios of 10:1 or 2:1 was injected intracranially. At 10:1 ratio, all 6 mice have survived for over 15 weeks, and even at 2:1 ratio MST was prolonged to 5.6 weeks (* $p < 0.05$).

G-CTLL: glioma-specific cytotoxic T lymphocyte clone.

MST: median survival time.

TDR: tumor death rate at 8 weeks.

D/T: number of mice died after tumor cell inoculation/ total number of mice inoculated intracranially.

i.e.: intracranial inoculation.

一方, Ts 細胞 (皮下移植した担腫瘍マウスにおいて, 宿主のサプレッサー活性がピークを示す腫瘍移植後3日目の脾細胞⁷⁴⁾あるいは Tc 細胞 (皮下移植した担腫瘍マウスにおいて, 宿主の CTL 活性がピークを示す腫瘍移植後14日目の所属リンパ節T細胞⁷⁵⁾) 5×10^7 個を移入した場合, 各々 MST は2.0, 3.6週, TDR はともに100%, D/T は5/5, 4/4であった。すなわち, Tc 細胞では延命効果がみられず, Ts 細胞ではむしろ逆効果 (MST の短縮) がみられた。Ts 細胞移入による逆効果は, サプレッサーT細胞の影響が起因しているものと考えられる。

従って, systemic adoptive immunotherapy をおこなう場合, G-CTLL 1 のような CTL クローン株を用いる必要性があり, しかもその投与数に依存して治療効果がみられることが確かめられた。

b) 203-glioma 細胞 5×10^5 個を移植した担腫瘍マウスに対し種々の時期に G-CTLL 1 1×10^7 個を静注し, G-CTLL 1 の投与時期による抗腫瘍効果の有無を検索した (Table 8)。Day 0 では全例生存している。Day 3, 5, 7 では各々 MST は6.6, 6.0, 6.8週, TDR は40, 60, 40%, D/T は2/5, 3/5, 2/5であった。すなわち, 7日以内に G-CTLL 1 を投与すれば延命効果がみられ, Day 0 で最も強い抗腫瘍効果が発揮された。しかしながら, Day 10, 16 では各々 MST は2.6, 2.4週, TDR はともに100%, D/T はともに5/5であり, むしろ逆効果 (MST の短縮) であった。一方, Day 7, 16 に PBS のみを静注した場合, 各々

Table 7. *Effects of adoptive transfer of G-CTLL 1 on survival of intracranial tumor-bearing mice*

Dose of adoptive transfer (i.v. on Day 7 after i.c.)		Survival and Mortality		
		MST	TDR	D/T
G-CTLL 1:	5×10^7	15<	0	1/14
	2×10^7	15<	0	0/10
	1×10^7	6.1*	50	4/8
	5×10^6	5.9*	50	5/10
	1×10^6	3.8	100	8/8
Ts	5×10^7	2.0**	100	5/5
Tc	5×10^7	3.6	100	4/4
PBS only		3.3	100	4/4

Various doses of G-CTLL 1 or immune T cells (Ts or Tc) were injected i.v. on Day 7 after i.c. of 5×10^5 203-glioma cells. In groups of mice transferred with 5×10^7 and 2×10^7 G-CTLL 1 cells, all mice except one have survived for over 15 weeks. In groups of mice transferred with 1×10^7 and 5×10^6 G-CTLL 1 cells, MST was prolonged to 6.1 and 5.9 weeks, respectively (* $p < 0.05$) and each TDR was 50%. D/T was 4/8 and 5/10, respectively and remaining 4 and 5 mice have survived for over 15 weeks, respectively. That is, considerable therapeutic effects of G-CTLL 1 cells were found when transferred more than 5×10^6 G-CTLL 1 cells i.v. On the other hand, survival was not affected in groups of mice transferred with 1×10^6 G-CTLL 1 cells and 5×10^7 Tc cells. In groups of mice transferred with 5×10^7 Ts cells, however, survival was rather reduced (MST; 2.0 weeks, TDR; 100%, D/T; 5/5) (* $p < 0.05$), suggesting strongly that suppressor T cells or their precursor cells exist predominantly in Ts cells and regulate immune responses in tumor-bearing host. Therefore, it seemed to be necessary to apply tumor-specific cytotoxic T lymphocyte clone such as G-CTLL 1 cell line in adoptive immunotherapy. G-CTLL: glioma-specific cytotoxic T lymphocyte clone.

Tc: regional lymph node T cells in mice 14 days after s.c. of 203-glioma cells. Tc exhibited a peak cytotoxic activity in subcutaneous tumor-bearing mice⁷³⁾.

Ts: splenic T cells in mice 3 days after s.c. of 203-glioma cells. Ts exhibited a peak suppressor activity in subcutaneous tumor-bearing mice⁷⁴⁾.

MST: median survival time.

TDR: tumor death rate at 8 weeks.

D/T: number of mice died after tumor cell inoculation/total number of mice inoculated intracranially.

i.c.: intracranial inoculation.

s.c.: subcutaneous inoculation.

MST は 3.4, 2.3 週, TDR はともに 100%, D/T は 4/4, 3/3 であった. 故に, Day 10 が IICP の出現時期に, Day 16 が IICP の進行時期に相当している⁷³⁾と

と考えあわせると, Day 10, 16 での G-CTLL 1 投与による逆効果は静注による脳血流増加に伴う IICP の増悪化が主因と考えられた.

なお, データは示していないが, Day 0 の場合, G-CTLL 1 1×10^6 個の静注でも MST が 5.3 週となりその抗腫瘍効果がみられた.

c) 203-glioma 細胞 2.5×10^5 , 5×10^5 または 1×10^6 個を移植した担脳腫瘍マウスに対し, 移植後 7 日目に G-CTLL 1 2×10^7 個を静注し, 頭蓋内移植腫瘍細胞数と G-CTLL 1 の移入効果との関係をみた (Table 9). 2.5×10^5 または 5×10^5 個の場合, 全例 10 週以上生存している. 1×10^6 個の場合も, MST は 6.4 週, TDR は 40%, D/T は 4/10 であり, 延命効果がみられた.

IV. 考 察

悪性グリオーマに対する免疫補助療法は, 十数年前より主に免疫賦活剤 (BCG, CWS, PS-K, OK-432, lentinan など) を用いた非特異的免疫療法として広く試みられてきている. しかしながら, その治療効果は満足すべきものとはいえない現状であり, 今後あまり期待できないと思われる.

近年の著しい免疫学の進展にともない, TCGF による T 細胞の長期培養法ならびにクローニング法などの新しい技術の導入が可能となり, T 細胞の抗原認識機構, 標的細胞破壊機構など数多くの基礎的分野の問題が解明されつつある^{28,32,36,54,56,67)}. さらに, マウスにおいては, 長期培養 CTL クローン株の治療実験に関する報告も次第に増加しつつあり^{3,11,10,11,12,16,17,38,65)}, いわゆる癌免疫療法をめぐる新しいアプローチが再検討されてきている.

われわれも, 悪性グリオーマに対し TCGF により腫瘍特異的 CTL クローン株である G-CTLL を樹立しそれらを応用した特異的免疫療法の確立を目的に本研究を試みた. 現時点まで, このような研究報告は脳神経外科学分野においてわれわれの報告以外にはみられないようである.

われわれは, マウス悪性グリオーマ (203-glioma) の系において目的とする G-CTLL を 2 株 (G-CTLL 1, 2) 得ることができ, そのうち CTL 活性がより強い G-CTLL 1 について, まずその免疫生物学的性状を検索した. G-CTLL 1 は以下の特徴を有していた.

1. G-CTLL 1 が syngeneic glioma (203-glioma) 以外の腫瘍に対し CTL 活性を示したのは, allogeneic glioma (RSV-M) のみであり, マウスグリオーマに対

Table 8. Chronological study of administration of G-CTLL 1 cells in therapeutic effects

i.v. of G-CTLL 1 (i.c.: 5×10 ⁵)		Survival and Mortality					
		Day 0	Day 3	Day 5	Day 7	Day 10	Day 16
1×10 ⁷	MST	10<	6.6*	6.0*	6.8*	2.6**	2.4**
	TDR	0	40	60	40	100	100
	D/T	0/5	2/5	3/5	2/5	5/5	5/5
PBS	MST	ND	ND	ND	3.4	ND	2.3**
	TDR	ND	ND	ND	100	ND	100
	D/T	ND	ND	ND	4/4	ND	3/3

1×10⁷ G-CTLL 1 cells were injected i.v. various days after i.c. of 5×10⁵ 203-glioma cells. On Day 0, all 5 mice have survived for over 10 weeks. On Day 3, 5 and 7, MST was prolonged to 6.6, 6.0 and 6.8 weeks, respectively (*p<0.05) and TDR was 40, 60 and 40%, respectively. D/T was 2/5, 3/5 and 2/5, respectively and remaining 3, 2 and 3 mice have survived for over 10 weeks. That is, considerable therapeutic effects of G-CTLL 1 cells were found when transferred 1×10⁷ G-CTLL 1 cells i.v. by the 7th day after i.c. On the contrary, MST was reduced to 2.6 and 2.4 weeks, respectively (*p<0.05), on Day 10 and 16, when the intracranial pressure began to increase. Even when only PBS (1 ml) was injected i.v. into mice 16 days after i.c., MST was reduced to 2.3 weeks (**p<0.05). Therefore, the therapeutic effects of G-CTLL 1 cells were not detected when transferred more than 10 days after i.c. probably due to the further deterioration of IICP after i.v. injection.

G-CTLL: glioma-specific cytotoxic T lymphocyte clone.
IICP: increased intracranial pressure.
i.c.: intracranial inoculation. MST: median survival time.
TDR: tumor death rate at 8 weeks. D/T: number of mice died after tumor cell inoculation/total number of mice inoculated intracranially.
PBS: phosphate-buffered saline. ND: not done.

Table 9. Relationship between therapeutic effects of G-CTLL 1 cells and dose of tumor cell inoculation

i.c. dose (i.v.: 2×10 ⁷)	Survival and Mortality		
	MST	TDR	D/T
2.5×10 ⁵	10<	0	0/6
5.0×10 ⁵	10<	0	0/8
1.0×10 ⁶	6.4*	40	4/10

Various doses of tumor cells were inoculated intracranially and 7 days later 2×10⁷ G-CTLL 1 cells were injected i.v. In groups of mice inoculated with 2.5×10⁵ or 5×10⁵ tumor cells, all mice have survived for over 10 weeks. In a group of mice inoculated with 1×10⁶ tumor cells, MST was prolonged to 6.4 weeks (*p<0.05) and TDR was 40%. D/T was 4/10 and remaining 6 mice have survived for over 10 weeks.

G-CTLL: glioma-specific cytotoxic T lymphocyte clone.
MST: median survival time.
TDR: tumor death rate at 8 weeks.
D/T: number of mice died after tumor cell inoculation/total number of mice inoculated intracranially.
i.c.: intracranial inoculation.

し腫瘍特異性を有しているものと考えられた。

2. 膜抗原は, Thy-1⁺, Lyt-1⁻2⁺3⁺, asialo-GM1⁻であり, CTL に特異的とされる抗マウス Lyt-2 抗体単独による CTL 活性阻止作用を受けた^{15,18,19,32,37,41,50,64}。

3. 免疫 IFN 産生能を有し, mitogen (Con A) ならびに tumor antigen (203-glioma および RSV-M) 刺激で増強された. tumor antigen による免疫 IFN 産生は, G-CTLL 1 がマウスグリオーマに対し腫瘍特異性を示したのに一致して 203-glioma および RSV-M の刺激で強度に増強されたことから, マウスグリオーマ関連抗原に関与しているものと考えられる. 一般に, 免疫 IFN は T リンパ球より産生されることが知られている^{14,53}. とくに, 抗原刺激による場合, 免疫 IFN 産生は H-2 K. D 抗原に関与していると報告されている³⁴. 最近, TCGF 依存性 CTL クローン株を用いた実験から CTL, TCGF および免疫 IFN の三者間の相互関係, とくに CTL の分化・増殖に関する研究が注目されている^{20,35,42,43,47,70}. このような点からみても, G-CTLL 1 はマウス悪性グリオーマ

に対する治療実験ばかりでなく CTL, TCGF および免疫 IFN の相互関係を検索する上においても優れた CTL クローン株であると思われる。

4. 凍結保存による G-CTLL 1 の増殖能, TCGF 依存性, 腫瘍特異性ならびに免疫 IFN 産生能は維持されている。

次に, G-CTLL 1 の *in vivo* における抗腫瘍効果を Winn-type neutralization assay および systemic adoptive transfer assay から判定すると, その抗腫瘍性は充分に発揮されていることがわかった。とくに, 後者による判定の場合, G-CTLL 1 の投与時期およびその投与数に依存していた。すなわち, 203-glioma 細胞 5×10^5 個を移植した担腫瘍マウスに対し G-CTLL 1 を投与する場合, 腫瘍移植後 7 日 (Day 7) 以内であれば 5×10^6 個以上でその治療効果がみられた。しかも, Day 0 ならば 1×10^6 個でもその治療効果がみられた。しかしながら, 投与時期が 10 日を過ぎると腫瘍増殖にともなう IICP の影響⁷³⁾ のため, G-CTLL 1 投与の治療効果は消失した。一方, Tc 細胞 (皮下移植をおこなった担腫瘍マウスにおいて宿主の CTL 活性がピークを示す腫瘍移植後 14 日目の所属リンパ節 T 細胞⁷³⁾) あるいは Ts 細胞 (皮下移植をおこなった担腫瘍マウスにおいて宿主のサプレッサー活性がピークを示す腫瘍移植後 3 日目の脾細胞⁷⁴⁾) 5×10^7 個を Day 7 に投与した場合, 前者では治療効果はみられず後者ではむしろ逆効果であった。従って, systemic adoptive immunotherapy をおこなう場合, CTL クローン株であることが必要と考えられた。

G-CTLL 1 の systemic adoptive immunotherapy の治療効果の作用機序として, 脳腫瘍により脳血液関門の破壊が生じ G-CTLL 1 が target organ である脳腫瘍内またはその周辺にまで到達した可能性, あるいは G-CTLL 1 を移入した結果, 二次的に宿主の抗腫瘍免疫応答が刺激されたために腫瘍増殖が抑制または阻止された可能性が考えられる。後者の可能性に関連し以下のことが推察される。頭蓋内腫瘍移植に随伴する宿主の CTL に関連した免疫応答を末梢リンパ性器官のひとつである脾臓における CTL 活性の経時的推移から観察すると, 皮下移植の場合と異なり腫瘍移植後徐々に CTL 活性が上昇し 10 日以降 (IICP の出現に一致して), 急速に減弱することがわかった⁷³⁾。従って, G-CTLL 1 を 7 日以内に移入すれば宿主の有する CTL 活性が増強され G-CTLL 1 投与の治療効果がみられ, 10 日以降に G-CTLL 1 を移入すれば IICP

が増悪しむしろ逆効果を招く結果となったものと思われる。また, G-CTLL 1 は免疫 IFN 産生能を有していることから, G-CTLL 1 の移入により宿主の液性因子を介する免疫反応あるいは細胞性免疫能の賦活化が生じ, 二次的に宿主の抗腫瘍性が増強されることも考えられる。文献上, 免疫 IFN は, 腫瘍細胞に対し direct cytolytic effect を有し⁷¹⁾, 一方では, pre-CTL から CTL への分化誘導促進作用および CTL 活性増強作用^{20, 35, 42, 43, 47, 70)}, サプレッサー T 前駆細胞からサプレッサー T 細胞への分化誘導阻害作用およびサプレッサー活性抑制作用²²⁾ あるいはマクロファージの抗腫瘍活性増強作用⁶⁾ など多種多様の作用を有していることが報告されている^{5, 29)}。

最近, 増加しつつある CTL クローン株を用いた治療実験に関する報告^{3, 4, 10, 11, 12, 16, 17, 38, 65)} の中で, systemic adoptive immunotherapy に chemotherapy を併用したいわゆる systemic adoptive chemoimmunotherapy の必要性が強調されている^{3, 10, 16)}。Cheever らによれば, マウス白血病 (FBL-3) の系において感作 T リンパ球を TCGF 存在下に長期培養を試み, 部分精製 TCGF と共に非クローン化長期培養 T リンパ球を宿主に静注してもその治療効果はみられず cyclophosphamide を併用するとその治療効果がみられたと報告している。Berenson, Erberlein らも同様の実験報告をしている。このように単に長期培養 CTL の systemic adoptive immunotherapy のみではその治療効果は期待できず, systemic adoptive chemoimmunotherapy の有用性が指摘されている。しかしながら, 彼らの実験系では, 用いた腫瘍細胞株が advanced disseminated leukemic or lymphoma cell lines であり全身性への浸潤が強く, さらに移入リンパ球は TCGF 存在下に長期培養をおこなったもののクローン化していないために, 単に systemic adoptive immunotherapy のみではその治療効果がみられなかったものと考えられる。それに対し, 203-glioma は頭蓋内に限局し他臓器への転移がなく, しかも G-CTLL 1 が腫瘍特異的 CTL クローン株であることから, G-CTLL 1 の systemic adoptive immunotherapy 単独であってもその治療効果が得られたものと考えられる。勿論, われわれの実験系においても chemotherapy を併用すれば, その相加あるいは相乗効果は充分に期待される。

ところで, CTL クローン株など長期培養リンパ球を用いた systemic adoptive immunotherapy の臨床応用には種々の重大な問題点が指摘されている。すな

わち、

1. Abnormal migration or trapping¹³⁾: in vitro で長期培養したリンパ球クローンでは膜抗原・膜リセプターや細胞内の酵素学的機構の変化などが生じており、それらを生体内に移入した場合、肺、脾、肝臓などへの migration あるいは trapping がみられ、リンパ球の normal recirculation がみられない。この問題点は、移入したクローンが target organ へ到達し得るのか否かに関係している。われわれの調べた限りでは、この点を検索した報告は見あたらない。今後、radioisotope でラベルした G-CTLL 1 を移入した後、autoradiography などの方法を用い G-CTLL 1 の target organ すなわち脳への分布を確かめる必要がある。
2. Functioning tumorigenesis⁶⁸⁾: in vitro で TCGF 存在下に長期培養しているリンパ球クローンが TCGF 非依存性に増殖能を有し腫瘍化する可能性がある。これは最も憂慮すべき問題点である。
3. Excessive TCGF-dependency⁴⁴⁾: リンパ球クローンが外因性 TCGF に依存性であるか故に、移入後速やかにクローンが血中から消失してしまう可能性がある。
4. Anti-idiotypic antibody^{21,54)}: リンパ球クローンを移入したためそれに対する抗体が産出され、結果的にクローンの抗腫瘍性を阻害してしまう可能性がある。
5. Rapid clearance of TCGF³⁶⁾: 外因性 TCGF をリンパ球クローンとともに生体内に投与する場合、外因性 TCGF は主に腎から速やかに排泄されるため、クローンも速やかに消失してしまう可能性がある。
6. Presence of TCGF-inhibitor in the serum³¹⁾: 血中に TCGF 活性阻害因子が存在しているため、リンパ球クローンが速やかに消失してしまう可能性がある。
7. Residual lectin in TCGF preparation^{39,56)}: 外因性 TCGF をリンパ球クローンとともに生体内に投与する場合、極少量のレクチンが残存していれば、他因子の産生が促進されクローンの in vivo における抗腫瘍効果が軽減される可能性がある。

以上の点から、ヒト脳腫瘍に対するヒト G-CTLL の systemic adoptive immunotherapy は、他臓器へ転移しない glioma の性質を考慮すると、局所へ埋込んだ Ommaya's reservoirなどを介して脳腫瘍内へ直接移入 (local adoptive immunotherapy) する方がより望ましいと考えられる。さらに、用いる G-CTLL が TCGF 依存性であるため、TCGF の併用がより効果的と考えられる。TCGF を生体内に投与する場合、従来の

ヒトリンパ球をレクチン (phytohemagglutinin, PHA) で刺激した後に種々の手法を用い部分精製を試みて得られた TCGF では、とくに純度や生産量などの点で臨床応用には問題があり、その精製方法の改良が必要である。最近、遺伝子工学的手法により均質で大量の TCGF を得ることが可能となってきたこともあり、脳神経外科学分野における G-CTLL および TCGF を用いた特異的免疫療法は将来十分に臨床応用への可能性があり、しかもその治療効果も大いに期待できるものと考えられる。

V. 結 語

悪性グリオーマに対する免疫療法のひとつとして、TCGF およびそれにより樹立した G-CTLL を用いた特異的免疫療法の確立を目的に、その前段階としてマウスモデル実験を試みた。

1. 目的とする G-CTLL が2株 (G-CTLL 1, 2) 得られた。両者ともに TCGF 依存性に exponential に増殖した。syngeneic glioma (203-glioma) に対しより強度の CTL 活性を示した G-CTLL 1 について、その免疫生物学的性状ならびに in vivo における抗腫瘍性を検索した。
2. G-CTLL 1 が 203-glioma 以外の腫瘍株に対し CTL 活性を示したのは allogeneic glioma (RSV-M) のみであった。故に、G-CTLL 1 はマウスグリオーマに対し腫瘍特異性を有しているものと思われた。膜抗原は Thy-1*, Lyl-1-2,*3+, asialo-GM₁ であり、CTL に特異的とされる抗マウス Lyl-2 抗体単独による CTL 活性阻止作用を受けた。さらに、G-CTLL 1 は免疫 IFN 産生能を有し、mitogen (Con A) ならびに tumor antigen 刺激で増強された。後者による免疫 IFN 産生は、G-CTLL 1 がマウスグリオーマに対し腫瘍特異性を示したのに一致して 203-glioma と RSV-M の刺激で強度にみられ、マウスグリオーマ関連抗原に関与しているものと考えられた。凍結保存による G-CTLL 1 の増殖能、TCGF 依存性、腫瘍特異性および免疫 IFN 産生能は維持されている。
3. G-CTLL 1 の in vivo における抗腫瘍効果は、Winn-type neutralization assay ならびに systemic adoptive transfer assay で十分に発揮されていることが確かめられた。従って、G-CTLL および TCGF を応用した特異的免疫療法はヒト悪性グリオーマに対しても大いに期待され、その可能性に関しても考察を加えた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました半田肇教授に深甚なる感謝の意を表します。また、終始御指導、御鞭達いただきました山下純宏講師に衷心より感謝いたしますとともに、実験に関し御指導、御協力いただ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、難波雄二郎助教授、上田正道助手、田口正明助手、同研究所細胞ウイルス部門川出由己教授、渡辺好彦助手に深謝いたします。なお、腫瘍細胞株 RSV-M, C-1300 を御供与いただきました新潟大学脳神経外科学教室田中隆一教授、関口賢太郎助手、ならびに B-16, YM-12 を御供与いただきました北海道大学医学部痛研究施設病理部門小林 博教授、細川真澄男助教授、石川 誠助手、柚木直也助手に深謝いたします。

References

- 1) Apuzzo MLJ and Mitchell MS: Immunological aspects of intrinsic glial tumors. *J Neurosurg* **55**: 1-18, 1981.
- 2) Baker PE, Gillis S, et al: Monoclonal cytolytic T-cell lines. *J Exp Med* **149**: 273-278, 1979.
- 3) Berenson JR, Einstein AB Jr, et al: Syngeneic adoptive immunotherapy and chemoimmunotherapy of a Friend leukemia: Requirement for T-cells. *J Immunol* **115**: 234-238, 1975.
- 4) Bertoglio J, Gerlier D, et al: Cultured T lymphocytes cytotoxic for a syngeneic lymphoma: Derivation in Con A-conditioned medium and in vivo activity. *Clin Exp Immunol* **44**: 137-144, 1981.
- 5) Bloom BR: Interferon and the immune system. *Nature* **284**: 593-595, 1980.
- 6) Boraschi D, Soldateschi D, et al: Macrophage activation by interferon: Dissociation between tumoricidal capacity and suppressive activity. *Eur J Immunol* **12**: 320-326, 1982.
- 7) Brooks WH, Latta RB, et al: Immunobiology of primary intracranial tumors. *J Neurosurg* **54**: 331-337, 1981.
- 8) Campbell JB, Grunberger T, et al: A microplaque reduction assay for human and mouse interferon. *Can J Microbiol* **21**: 1247-1253, 1975.
- 9) Chang C, Chang R, et al: Generation of cytotoxic lymphocytes by SV40-induced antigens. *J Immunol* **128**: 2160-2163, 1982.
- 10) Cheever MA, Greenberg PD, et al: Specificity of adoptive chemoimmunotherapy of established syngeneic tumors. *J Immunol* **125**: 711-714, 1980.
- 11) Cheever MA, Greenberg PD, et al: Specific adoptive therapy of established leukemia with syngeneic lymphocytes sequentially immunized in vivo and in vitro and non-specifically expanded by culture with interleukin 2. *J Immunol* **126**: 1318-1322, 1981.
- 12) 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.
- 13) Dailey MO, Fathman CG, et al: Abnormal migration of T lymphocyte clones. *J Immunol* **128**: 2134-2136, 1982.
- 14) Deley M, Damme Von J, et al: Interferon induced in human leukocytes by mitogen: Production, partial purification and characterization. *Eur J Immunol* **10**: 877-883, 1980.
- 15) Dialynas DP, Loken MR, et al: Lyt-2-/Lyt-3- variants of a cloned cytotoxic T-cell line lack an antigen receptor functional in cytotoxicity. *J Exp Med* **153**: 595-604, 1981.
- 16) Erberlein TJ, Rosenstein M, et al: Adoptive chemoimmunotherapy of a syngeneic murine lymphoma with long-term cultured lymphoid cell lines expanded in T-cell growth factor. *Cancer Immunol Immunother* **13**: 5-13, 1982.
- 17) Erberlein 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.
- 18) Fan J, Ahmed A, et al: Studies on the induction and expression of T-cell mediated immunity. XI. Inhibition by Lyt-2,3 antisera of cytotoxic T lymphocyte-mediated antigen-specific and non-specific cytotoxicity: Evidence for the blocking of the binding between T lymphocytes and target cells and not the post-binding cytolytic steps. *J Immunol* **125**: 2444-2453, 1980.
- 19) Fan J and Bonavida B: Studies on the induction and expression of T cell-mediated immunity. XII. The concomitant loss and recovery of membrane-associated Lyt-2 antigens, lymphocyte-target cell binding, and antigen-specific and non-specific cytotoxic activity of alloimmune T lymphocytes after treatment with trypsin. *J Immunol* **127**: 1856-1864, 1981.
- 20) Farrar WL, Johnson HM, et al: Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2. *J Immunol* **126**: 1120-1125, 1981.
- 21) Fathman CG and Kimoto M: Studies utilizing murine T-cell clones: Ir genes, Ia antigens and MLR stimulating determinants. *Immunol Rev* **54**: 57-79, 1981.
- 22) Fradelizi D and Gresser I: Interferon inhibits the generation of all-specific suppressor T lymphocytes. *J Exp Med* **155**: 1610-1622, 1982.
- 23) Gillis S, Baker PE, et al: Long-term culture of human antigen-specific cytotoxic T-cell lines. *J Exp Med* **148**: 1093-1098, 1978.
- 24) Gillis S and Smith KA: Long term culture of

- tumor-specific cytotoxic T-cells. *Nature* **268**: 154-156, 1977.
- 25) Gillis S and Watson J: Interleukin-2 dependent culture of cytotoxic T-cell lines. *Immunol Rev* **54**: 81-109, 1981.
- 26) Giorgi JV and Warner NL: Continuous cytotoxic T-cell lines reactive against murine plasmacytoma tumor-associated antigen. *J Immunol* **126**: 322-330, 1981.
- 27) Giorgi JV, Zawadzki JA, et al: Cytotoxic T lymphocyte lines reactive against murine plasmacytoma antigens: Dissociation of cytotoxicity and Lyt-2 expression. *Eur J Immunol* **12**: 831-837, 1982.
- 28) Golstein P, Goridis C, et al: Lymphoid cell surface interaction structures detected using cytotoxic-inhibiting monoclonal antibodies. *Immunol Rev* **68**: 5-42, 1982.
- 29) Gresser I: On the varied biologic effects of interferon. *Cell Immunol* **34**: 406-415, 1977.
- 30) Habel K and Belcher JH: Immunologically privileged sites in studies of polymoma tumor antigens. *Proc Soc Exp Biol Med* **113**: 148-152, 1963.
- 31) Hardt C, Röllinghoff M, et al: Lyt-2.3⁺ cyclophosphamide-sensitive T-cells regulate the activity of an interleukin 2 inhibitor in vivo. *J Exp Med* **154**: 262-274, 1981.
- 32) Hollander N: Effects of anti-Lyt antibodies on T-cell functions. *Immunol Rev* **68**: 43-66, 1982.
- 33) 互井美津江: 実験的腫瘍の病理学的研究. 可移植性実験腫瘍移植の組織, 化学組織培養法による検索. 北関東医学 **119**: 1-25, 1969.
- 34) Kirchner H, Zawatzky R, et al: Interferon production in the murine mixed lymphocyte culture. I. Interferon production caused by differences in the H-2K and H-2D region but not by differences in the I region or the M locus. *Eur J Immunol* **9**: 97-99, 1979.
- 35) Klein JR, Raulet DH, et al: Cytotoxic T lymphocytes produce immune interferon in response to antigen or mitogen. *J Exp Med* **155**: 1198-1203, 1982.
- 36) Larsson EL, Gullberg M, et al: Requirement for the involvement of clonally distributed receptors in the activation of cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Rev* **68**: 67-77, 1982.
- 37) Ledbetter JA and Seaman WE: The Lyt-2, Lyt-3 macromolecules: Structural and functional studies. *Immunol Rev* **68**: 197-218, 1982.
- 38) Lotze MT, Line BR, et al: The in vivo distribution of autologous human and murine lymphoid cell grown in T-cell growth factor (TCGF). Implications for the adoptive immunotherapy of tumors. *J Immunol* **125**: 1487-1493, 1980.
- 39) Lotze MT and Rosenberg SA: In vitro growth of cytotoxic human lymphocytes. III. The preparation of lectin-free T-cell growth factor (TCGF) and an analysis of its activity. *J Immunol* **126**: 2215-2220, 1981.
- 40) Lotze MT, Strausser JL, et al: In vitro growth of cytotoxic human lymphocytes. II. Use of T-cell growth factor (TCGF) to clone human T-cells. *J Immunol* **124**: 2972-2978, 1980.
- 41) MacDonald HR, Glasebrook AL, et al: Clonal heterogeneity in the functional requirement for Lyt-2/3 molecules on cytolytic T lymphocytes (CTL): Possible implications for the affinity of CTL antigen receptors. *Immunol Rev* **68**: 116, 1982.
- 42) Marcucci F, Waller M, et al: Production of immune interferon by murine T-cell clones from long-term cultures. *Nature* **291**: 79-81, 1981.
- 43) McKimm-Breschkin JL, Mottram PL, et al: Antigen-specific production of immune interferon by T-cell lines. *J Exp Med* **155**: 1204-1209, 1982.
- 44) Mills GB, Carlson G, et al: Generation of cytotoxic lymphocytes to syngeneic tumors by using co-stimulator (interleukin 2): In vivo activity. *J Immunol* **125**: 1904-1909, 1980.
- 45) Möller G: T-cell clones. *Immunol Rev* **54**: 1-266, 1981.
- 46) Morantz RA, Shain W, et al: Immune surveillance and tumors of the nervous system. *J Neurosurg* **49**: 84-92, 1978.
- 47) Morris AG, Lin YL, et al: Immune interferon release when a cloned cytotoxic T-cell line meets its correct influenza-infected target cells. *Nature* **295**: 150-152, 1982.
- 48) 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.
- 49) 中尾哲, 難波雄二郎, 他: グリオーマ移植マウスにおけるキラー細胞の動態. *Neurol Med Chir* **18**: 393-400, 1978.
- 50) Nakayama E: Blocking of effector cell cytotoxicity and T-cell proliferation by Lyt antisera. *Immunol Rev* **68**: 117-134, 1982.
- 51) Neuwelt EA and Clark K: Clinical aspects of neuroimmunology. In: Williams and Wilkins (ed.), Baltimore Press, 1978.
- 52) Osborne LC, Georgiades JA, et al: Classification of interferons with antibody to immune interferon. *Cell Immunol* **53**: 65-70, 1980.
- 53) Perussia B, Mangoni L, et al: Interferon production by human and murine lymphocytes in response to alloantigens. *J Immunol* **125**: 1589-

- 1595, 1980.
- 54) Ramseier H, Aguet M, et al: Similarity of idiotypic determinants of T- and B-lymphocyte receptors for alloantigens. *Immunol Rev* **34**: 50-58, 1977.
- 55) Rosenberg SA, Spiess PJ, et al: In vitro growth of murine T-cells. IV. Use of T-cell growth factor (TCGF) to clone lymphoid cells. *Cell Immunol* **54**: 293-306, 1980.
- 56) 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.
- 57) Ruscetti FW, Morgan DA, et al: Functional and morphologic characterization of human T-cells continuously grown in vitro. *J Immunol* **119**: 131-138, 1977.
- 58) Sarmiento M, Dialynas DP, et al: Cloned T lymphocytes and monoclonal antibodies as probes for cell surface molecules active in T-cell mediated cytotoxicity. *Immunol Rev* **68**: 135-170, 1982.
- 59) Scheinberg LC, Edelman FA, et al: Is the brain "an immunological privileged site?" I. Studies based on intracerebral tumor homotransplantation and iso-transplantation to sensitized hosts. *Arch Neurol* **11**: 248-264, 1964.
- 60) Scheinberg LC, Kotsillimas DG, et al: Is the brain "an immunological privileged site?" III. Studies based on homologous skin grafts to the brain and subcutaneous tissues. *Arch Neurol* **15**: 62-67, 1966.
- 61) Scheinberg LC, Levy WA, et al: Is the brain "an immunological privileged site?" II. Studies in induced host resistance to transplantation mouse glioma following irradiation of prior implants. *Arch Neurol* **13**: 283-286, 1965.
- 62) Scheinberg LC, Suzuki K, et al: Studies in immunization against a transplantable cerebral mouse glioma. *J Neurosurg* **20**: 312-316, 1963.
- 63) Schreier MH, Jscove NM, et al: Clones of killer and helper T-cells: Growth requirements, specificity and retention of function in long-term culture. *Immunol Rev* **51**: 337-357, 1980.
- 64) Shinohara N and Sachs DH: Mouse alloantibodies capable of blocking cytotoxic T-cell function. I. Relationship between the antigen reactive with blocking antibodies and the Lyt-2 locus. *J Exp Med* **150**: 432-444, 1979.
- 65) Smith KA, Gillis S, et al: The inhibition of in vivo tumor growth by cytotoxic T-cell lines. (Abstract) *Proc Am Assoc Cancer Res* **20**: 93, 1919.
- 66) Spitz H, Jissel H, 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.
- 67) Springer TA, Davignon D, et al: LFA-1 and Lyt-2,3, molecules associated with T lymphocyte-mediated killing; and Mac-1, an LFA-1 homologue associated with complemented receptor function. *Immunol Rev* **68**: 171-196, 1982.
- 68) Takado M, Yamamoto H, et al: Cellular interactions in the activation of cytotoxic T-cell (Tc). Analysis of activation mechanism by using a functioning tumor of cloned Tc against a syngeneic tumor. *Proc Jap Soc Immunol* **11**: 67-68, 1981.
- 69) Takasugi M and Klein E: A microassay for cell mediated immunity. *Transplantation* **9**: 219-227, 1970.
- 70) Torres BA, Farrar WL, et al: Interleukin 2 regulates immune interferon (IFN γ) production by normal and suppressor cell cultures. *J Immunol* **128**: 2217-2219, 1982.
- 71) Tying S, Klimpel GR, et al: Direct cytotoxicity by partially-purified preparations of immune interferon. *Int J Cancer* **30**: 59-64, 1982.
- 72) Wiskstrand CJ and Bigner DD: Immunobiologic aspects of the brain and human gliomas. Case reports. *Am J Pathol* **98**: 517-567, 1980.
- 73) Yamasaki T, Handa H, et al: Characteristic immunological responses to an experimental mouse brain tumor. *Cancer Res* **43**: 4610-4617, 1983.
- 74) 山崎俊樹, 山下純宏, 他: 腫瘍免疫における抑制的制御機構. サプレッサーT細胞の動態の解析. *脳神経* **35**: 703-709, 1983.
- 75) Yron I, Wood TA, et al: In vitro growth of murine T-cells. V. The isolation and growth of lymphoid cells infiltrating syngeneic solid tumors. *J Immunol* **125**: 238-245, 1980.