

## 担癌ラットにおける宿主免疫能の変化と その LAK 細胞に及ぼす影響の解析

久保田 司 八 卷 稔 明

札幌医科大学脳神経外科講座 (主任 端 和夫 教授)

### Analysis of Alteration of Host Immunoreactivity Associated with Tumor-bearing and its Effect on Lymphokine Activated Killer Cells in a Tumor-bearing Rat Model

Tsukasa KUBOTA and Toshiaki YAMAKI

*Department of Neurosurgery, Sapporo Medical College*

(Chief : Prof. K. HASHI)

**ABSTRACT** Alteration in immunoreactivity associated with tumor-bearing is well recognized; however, the mechanisms of immunoregulation are still elusive, and little is known about their effects on immunotherapy with the use of lymphokine-activated killer (LAK) cells. A rat subcutaneous tumor-host model using a gliosarcoma cell line (T9) syngeneic to F344 rats was established, whereby alteration in the proliferation or cytotoxic activities of spleen cells of tumor-bearing hosts were assessed, and subsequently its cellular as well as humoral mechanisms and also its effects on the induction and cytotoxicity of LAK cells were analyzed. The rats showed splenomegaly with the growth of the tumor with more than a 2-fold increase in spleen cell number for 2 wks of tumor-bearing, which was sustained thereafter; however, the spleen cells of advanced (longer than 3 wks) tumor-bearing rats showed impaired reactivity to Con A and LPS stimulation and in MLTC and MLC, although no constitutional change was recognized in the spleen cell populations. The natural cytotoxic activities of the spleen cells were minimally affected as assessed by cytotoxicity against K562 or T9 tumor cells. Induction of LAK activity in the spleen cells of tumor-bearing rats showed apparent inhibition with the growth of the tumor. The presence of suppressor cells in the spleens of advanced tumor-bearing rats was demonstrated as they suppressed proliferative responses of normal spleen cells to Con A stimulation and in MLTC and MLC, which were free of MHC restriction. Those suppressor cells could also interfere with the induction of LAK cells, but not with the effector phase of LAK cells. Negative and positive cell selection experiments revealed suppressor cells to be of two kinds: plastic adherent cells, of which 70% were macrophages and monocytes, and CD5(-) CD8(+) T cells, both of them could suppress not only the proliferative responses of lymphoid cells, but also the induction of LAK cells. Serum of normal rats and rats bearing the T9 tumor from

#### Abbreviations:

Con A : concanavalin A	FACS : fluorescein activated cell sorter
FCS : fetal calf serum	FITC : fluorescein isothiocyanate
LAK : lymphokine-activated killer	LPS : lipopolysaccharide
M $\phi$ : macrophage	MHC : major histocompatibility complex
MLC : mixed lymphocyte culture	MLTC : mixed lymphocyte tumor cell culture
MMC : mitomycin C	NK : natural killer
PBS : phosphate buffered saline	r IL-2 : recombinant Interleukin-2,

initiation to 4 wks showed a similar degree of dose dependent suppression on cell proliferative responses regardless of tumor-bearing or its period. Induction of LAK cells was more strongly inhibited by serum showing parallel relation to the growth of tumor at more than 0.1% concentration. These data indicated that immunosuppressive mechanisms were generated in the late tumor-bearing rats which preferentially suppress cell proliferative responses and induction of LAK cells by two types of suppressor cells, plastic adherent cells and CD5(-) CD8(+) T cells. Serum inhibited lymphoid cell proliferation regardless of tumor-bearing, but suppression of the induction of LAK cells depended on the time of tumor-bearing. (Received December 27, 1990 and accepted January 17, 1991)

**Key Words:** Immunosuppression, Suppressor cells, Gliosarcoma, LAK cells, Tumor immunity

## 1 結 言

生体の免疫系は精巧な“ネットワーク”により支配されており、互いに拮抗する suppressor 細胞と amplifier 細胞のバランスにより調節されていると考えられている<sup>1)</sup>。ところが担癌状態では、特にその進行期において、suppressor 細胞が誘導されて、担癌宿主の特異的あるいは非特異的免疫反応が抑制されるという免疫抑制状態が形成され、この免疫抑制状態が宿主の抗腫瘍免疫作用をも抑制し、腫瘍の増大を助長することが知られている<sup>2,3)</sup>。担癌に伴う免疫抑制の程度は病期の進行や予後にも影響し得る<sup>4-6)</sup>が、この担癌による免疫抑制の機序については未だ不明な点が多い。

一方、脳腫瘍の治療に、従来の治療法に加えて養子免疫療法が導入され<sup>7)</sup>、中でも局所 LAK 療法が LAK 細胞の腫瘍局所への集積性、副作用の少なさなどで注目されている<sup>8,9)</sup>。しかし、この方法においても、LAK 細胞の *in vitro* で認められる抗腫瘍活性が必ずしも臨床効果として反映されていない<sup>8,9)</sup>。八巻らは LAK 細胞腫瘍内 infusion 法によるラット腫瘍拒絶モデルの実験において、担癌早期では LAK 細胞は直接的な細胞障害作用のみでなく、宿主の免疫系にもヘルパー作用を及ぼしうるが、担癌後期には LAK 細胞の抗腫瘍効果が発現され難くなることを認めている<sup>10)</sup>。また、実際に原発性脳腫瘍患者においても担癌による免疫抑制状態が形成されていることが報告されている<sup>4-6)</sup>。

*in vitro* の LAK 細胞の高い腫瘍細胞障害活性が *in vivo* の治療効果に反映してこない原因の1つとして、投与された LAK 細胞に対する宿主の担癌による免疫抑制状態の影響が考えられる。

本研究ではラット同系腫瘍 (gliosarcoma) を皮下移植してラット担癌モデルを作製し、担癌による免疫反応の変化を suppressor 細胞及び血清中の免疫抑制因子の観点より解析し、またこれらの LAK 細胞に及ぼす影

響について検討した。

## 2 実験方法

### 2・1 実験動物

動物は週齢 5-13 週の雄 Fisher 系 (F344/Ducrj) 及び WKA 系 (WKAH/Hkm) ラット (日本エスエルシー、浜松) を使用した。

### 2・2 腫瘍細胞

腫瘍細胞は名古屋大学脳神経外科吉田博士より供与された N-methylnitrosourea 誘発の Fisher ラット由来の gliosarcoma (T9) 細胞<sup>11)</sup> を使用した。T9 細胞は 6% FCS 加 RPMI1640 培養液で継代されている。使用時は 0.02% trypsin type III-S (Sigma) で処理して細胞を浮遊させた後、6% FCS 加 RPMI1640 培養液中に 4 時間培養したものをを用いた。その他、LAK 活性測定時の標的細胞 (target) として、T9 細胞のほか、継代培養していたヒト erythroleukemia 細胞株の K562 細胞及び Burkitt's lymphoma 細胞株の Daudi 細胞を使用した。

### 2・3 担癌ラット作製、脾細胞及び血清採取

T9 細胞  $1 \times 10^7$  個を Fisher ラットの背部皮下に移植して作製した担癌 1-4 週ラット、及び正常 Fisher ラットを使用した。これらのラットより無菌的に脾臓を摘出した後、Ficoll-Conray 比重遠心法 (比重 1.096, 1200 rpm, 20 min) によりリンパ球を含む単核球を分離して使用に供した。又これらのラットより心臓脱血により血液を採取し、培養器中に 60 分間放置した後、遠沈 (3000 rpm, 5 min) して血清を分離した。

### 2・4 試薬及び抗体

Con A (Honen) 及び LPS (Sigma) は 10% FCS 加 RPMI1640 培養液に溶解し冷蔵したものを使用した。rIL-2 は武田薬品工業より供与された TGP-3 を使用した。抗ラットリンパ球単クローン抗体として、本学病理学第 1 講座より提供された、R1-3B3 (抗ラット CD5

抗体), R1-10B5(抗ラット CD8 抗体)<sup>12)</sup>, RTH-7(抗ラット CD4 抗体)<sup>13)</sup>, R2-1A6(抗ラット顆粒球及び M $\phi$  抗体)<sup>14)</sup>, RTS-1(抗ラット CD45 抗体)<sup>15)</sup>, R2-8B1(抗ラット MHC class I 抗体)<sup>16)</sup>, MRC-OX-6(抗ラット MHC class II 抗体)<sup>17)</sup>, 3. 2. 3(抗ラット NK 細胞抗体)<sup>18)</sup>を用いた. 2次抗体として FITC-conjugated goat anti-mouse Ig (Vector Lab., U. S. A.), FITC-cojugated rabbit anti-mouse Ig (Melyo Lab., U. S. A.)を用いた. Anti-mouse Ig はラットに対する交差反応性を除去するため, 抗体をあらかじめ正常ラット血清にて吸収して使用した.

## 2.5 脾細胞のサブセットへの分離

未処理の脾細胞浮遊液 (whole) を一定量残し, 残りを 3% ウシ血清アルブミン加 Hanks balanced salt solution (Gibco) で  $1 \times 10^7$  個/ml の濃度に調整してプラスチックシャーレ中に浮遊させ, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養液で 60 分間培養して付着細胞を除去した. プラスチック付着細胞をビベッティングと Cell Lifter (Costar, 3008, MA) を用いて回収した (adherent). このプラスチック接着性を利用した方法<sup>19)</sup>を用いて回収した接着性細胞の約 70~75% が単球, M $\phi$  及び NK 細胞であることを確認している. 付着細胞除去後の細胞 (adherent depletion) を R1-3B3, R1-10B5, RTH-7 各抗体 200  $\mu$ l, 及び R1-3B3 と RTH-7 の混合 400  $\mu$ l とそれぞれ 4°C で 45 分間反応させた. 更に補体と反応させる目的で正常家兎血清を 200  $\mu$ l 加え, 37°C で 60 分間反応させ, 再度培養液で洗浄して, adherent-3B3 depletion, adherent-10B5 depletion, adherent-RTH depletion 及び adherent-3B3+RTH depletion の各サブセットに分けた. R1-3B3, R1-10B5 及び RTH-7 の単クローン抗体と補体を用いた細胞除去に関しては, 3 回の基礎実験の平均で, CD5 (+) 細胞の 68.1%, CD8 (+) 細胞の 59.3%, CD4 (+) 細胞の 53.7% が除去されることを確認している.

## 2.6 脾細胞の表面マーカーの解析

FACS (Becton-Dickinson, U. S. A.) を用いて, 正常及び担癌 1~4 週ラット脾細胞の各細胞群の占める割合を検索した. single-color analysis では, 脾細胞約  $1 \times 10^6$  個のペレットに 1 次抗体として各種単クローン抗体をそれぞれ 30  $\mu$ l 加え, 4°C で 45 分間反応させ, 2 次抗体として FITC-conjugated goat anti-mouse Ig を 30  $\mu$ l 加え, 4°C で 30 分間反応させた. FACS にて細胞 10000 個中における陽性細胞数を % で表示した. two-color analysis では, R1-3B3 陽性細胞を 2 次抗体 FITC conjugated rabbit anti-mouse Ig で標識した

後に, ビオチン化 R1-10B5 抗体, 次いで avidin-phycoerythrin と 4°C でそれぞれ 45, 30 分間反応させて 2 重染色した. R1-3B3, R1-10B5 両抗体陽性, 陰性細胞群の構成を同様に FACS で検索した.

## 2.7 リンパ球幼若化反応

リンパ球幼若化の刺激として Con A, LPS を用いた mitogen 刺激, 及び T9 細胞あるいは WKAH ラット脾細胞を用いたリンパ球混合培養を使用した. responder である脾細胞を 10% FCS 加 RPMI1640 培養液中に浮遊させ, 浮遊液の最終濃度が常に  $2 \times 10^6$  個/ml となるよう調整して, 96 well 平型プレートに 3 well 一組 (triplicate) で分配した. Con A, LPS は最終濃度がそれぞれ 5, 及び 25  $\mu$ g/ml となるように調整した. リンパ球混合培養では, T9 細胞あるいは WKAH ラット脾細胞浮遊液 ( $1 \times 10^7$  個/ml) に MMC (協和発酵) を 50  $\mu$ l/ml 加えて培養器で 45 分間反応させた後培養液で洗浄した. これらを, それぞれ MLTC, MLC の stimulator として, stimulator: responder 比が 1:5, 及び 1:2 の条件となるよう responder に加えた. また, リンパ球混合培養においては, responder の反応性を高めるため, 2-mercaptoethanol (Wako) を最終濃度が  $2 \times 10^{-5}$  M となるよう加えた. これらのプレートを一定期間培養し, 培養終了前の一定時間 methyl-<sup>3</sup>H-thymidine (Amersham) を 1  $\mu$ Ci/well 加えてパルスした. 培養終了後マイクロハーベスター (MASHII, Microbiological Associates, U. S. A.) により回収し, <sup>3</sup>H-thymidine の取り込みを液体シンチレーションカウンター (Beckman LSC5801, Beckman Instruments, U. S. A.) で測定した. 対照は脾細胞を, stimulator を加えずに 10% FCS 加 RPMI1640 培養液で培養し, それとの差 ( $\Delta$  cpm) で評価した. Con A, LPS 刺激はそれぞれ 48, 及び 72 時間混合培養し 4 時間パルスした. MLTC, MLC はそれぞれ 96 時間混合培養し 24 時間パルスした.

### 2.7.1 正常及び担癌脾細胞の各種リンパ球幼若化反応

正常及び担癌 1~3 週ラットの脾細胞を用いて Con A, LPS 刺激, また MLTC, 及び MLC に対する反応性を測定した.

### 2.7.2 担癌 3, 4 週脾細胞の正常リンパ球幼若化反応に対する影響

担癌 3 週あるいは 4 週 F344 ラットの脾細胞の suppressor 機能をみる目的で, MMC 処理した脾細胞を正常 F344 ラット及び WKAH ラット脾細胞 (responder) の Con A 刺激及び MLTC の反応系に加えて影響をみ

た。予備実験の結果より suppressor:responder 比を Con A 刺激では 1:1 から 0.125:1, MLTC では 4:1 から 0.5:1 に設定し, 免疫抑制効果の濃度依存性を観察した。

### 2・7・3 正常及び担癌血清の正常リンパ球幼若化反応に対する影響

正常及び担癌 1~4 週血清を正常脾細胞の Con A 刺激, MLTC 及び MLC の反応系に 25~0.1%の濃度で加え, 血清中の免疫抑制因子の有無及びその影響を検討した。

### 2・8 LAK 細胞誘導及び *in vitro* 細胞障害試験

2・5の方法に準じてラット脾細胞より附着細胞を除去した後, 10%FCS 加 RPMI1640 培養液により  $5 \times 10^6$  個/ml の濃度の脾細胞浮遊液とした。これに rIL-2 を最終濃度が 10 U/ml となるよう添加し, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 培養器で 4 日間培養して LAK 細胞 (effector) を誘導した。LAK 細胞の標的細胞に対する細胞障害活性を 4 hr <sup>51</sup>Cr-release assay により測定した。1×10<sup>7</sup>個の T9, K562 及び Daudi 細胞をそれぞれ 1 ml の培養液に浮遊させ, 100 μCi の sodium chromate (Amersham) を加え, 37°C で 60 分間反応させ, 標的細胞とした。third party として他の細胞を加える時も含め, 常に effector の最終濃度が  $5 \times 10^6$  ml, effector:target 比が 100:1 となるよう調節し, 96 well V 型プレートに入れ 600 rpm 5 分間遠心後, 培養器で 4 時間培養した。培養後 1600 rpm 5 分間遠心し, その上清各 100 μ 中のアイソトープをガンマカウンター (LKB Wallak Compugamma 1282) で測定した。effector の代わりに 10%FCS 加 RPMI1640 培養液を加えたものを spontaneous release とし, 5% Nonidet P-40 溶液を加えたものを maximum release とした。% specific lysis は以下の式で求めた。

% specific lysis =

$$\frac{\text{mean experimental cpm} - \text{mean spontaneous cpm}}{\text{mean maximum cpm} - \text{mean spontaneous cpm}} \times 100$$

### 2・8・1 正常及び担癌脾細胞の NK 活性及び LAK 活性

正常及び担癌 1~4 週ラットの脾細胞より LAK 細胞を誘導して, 担癌に伴う LAK 活性の変化を, T9, K562 及び Daudi 細胞を標的細胞として検討した。この際 IL-2 を添加しないで同様に培養したものを作製し, 培養後の NK 活性を測定した。

### 2・8・2 担癌 3, 4 週脾細胞の正常 LAK 活性に対する影響

MMC 処理した担癌 3 週あるいは 4 週脾細胞浮遊液

を suppressor として, 正常脾細胞 (effector) からの LAK 細胞誘導の系で suppressor:effector 比が 2:1 から 0.5:1 となるよう濃度を調整した。これを培養開始時に rIL-2 と同時に添加し, LAK 細胞誘導相における suppressor の影響を見た。4 日間培養した後, T9 細胞を標的細胞としてそれぞれ LAK 活性を測定した。同時に担癌ラットと同週齢の正常ラット脾細胞も同じく MMC 処理して suppressor の対照とした。

### 2・8・3 担癌 3, 4 週脾細胞各サブセットの正常 LAK 活性に対する影響

担癌 3 週あるいは 4 週脾細胞を 2・5 の方法により各サブセットに分け, MMC 処理して suppressor とした。これらを 2・8・2 と同様に, 正常脾細胞からの LAK 細胞誘導の系に suppressor:effector 比が 2:1 から 0.5:1 として LAK 細胞誘導相に加え, T9 細胞を標的細胞としてそれぞれ LAK 活性を測定した。また, suppressor を加えずに LAK 細胞を誘導し, LAK 活性測定の時点で同様の比率で suppressor を加え, 細胞障害相における suppressor の影響をみた。

### 2・8・4 正常及び担癌血清の正常 LAK 活性に対する影響

正常脾細胞からの LAK 細胞誘導の系において, LAK 細胞誘導相及び細胞障害相に, 正常及び担癌 1~3 週血清を 10~0.1%の濃度で加え, T9 細胞及び K562 細胞を標的細胞としてそれぞれ LAK 活性を測定した。

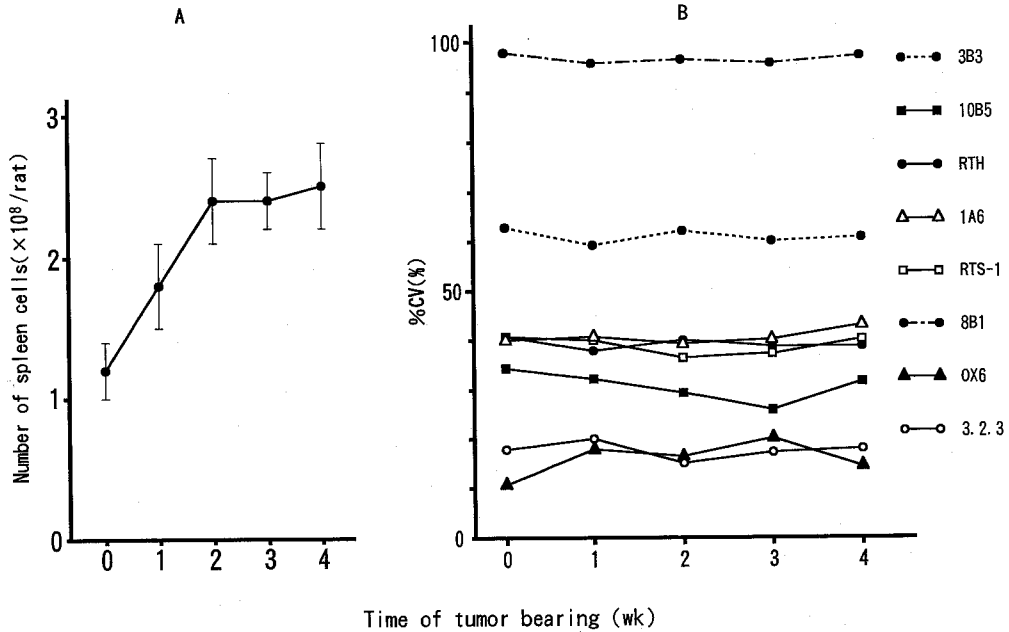
### 2・9 統計学的処理

いずれの実験においても実験は triplicate で行ない, それらの平均値±標準偏差で表示した。得られた結果を Student's paired, two tailed t-test を用いて有意差の検定を行なった。

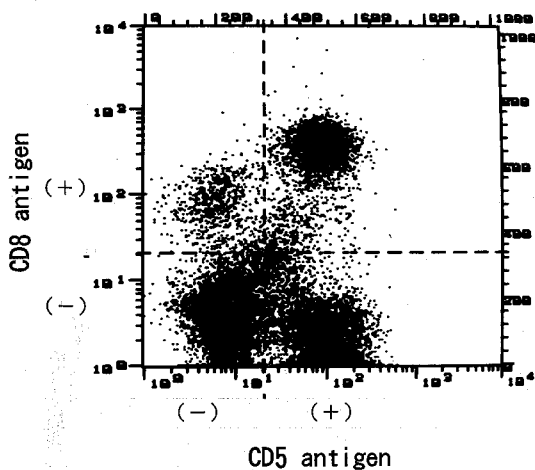
## 3 結 果

### 3・1 担癌に伴う脾細胞サブセットの変化

担癌ラットは腫瘍の増大と共に脾臓の腫大が認められるようになり, 脾細胞数は正常では  $1.2 \pm 0.2 \times 10^8$  個であるのに対し, 担癌 2~3 週では  $2.4 \pm 0.3 \times 10^8$  個となり, これが担癌 4 週でも維持されていた (Fig. 1A)。FACS による 8 種類の単クローン抗体を用いた single-color analysis では, 脾細胞の各細胞亜群は担癌の時期に関係なく, 正常及び担癌各週ではほぼ一定であった (Fig. 1B)。主な抗体陽性細胞の%は, 3 回の測定の平均で, CD 5(+):  $50.35 \pm 1.39\%$ , CD 8(+):  $20.03 \pm 3.24\%$ , CD 4(+):  $28.40 \pm 0.82\%$  であった。担癌 3 週脾細胞の two-color analysis では, 2 回の測



**Fig. 1** The number and phenotypic analysis of the spleen cells of 0-4 wk T9 tumor-bearing rats. The spleen was separated into single cell-suspension and number was counted by using a hemocytometer (Fig. 1A). The spleen cells were stained with 8 monoclonal Ab (R1-3B3, R1-10B5, RTH-7, R2-1A6, RTS-1, R2-8B1, MRC-OX-6 and 3. 2. 3) followed by FITC-conjugated goat mouse Ig as the second reagent. Positive cell volume (% CV) was measured by FACS (Fig. 1B).



**Fig. 2** Two-color analysis of the spleen cells of 3 wk T9 tumor-bearing rats. The spleen cells were stained with R1-3B3 (anti CD5 Ab) and FITC-conjugated rabbit anti-mouse Ig, and subsequently were stained with biotinylated R1-10B5 (anti CD8 Ab) and avidin-phycoerythrin.

定の平均で CD 5(-)・CD 8(+): 7.12%, CD 5(+). CD 8(+): 23.28%, CD 5(-)・CD 8(-): 36.27%, CD 5(+). CD 8(-): 33.41%であり, 正常脾細胞の構成と比べ差異は認めなかった (Fig. 2).

### 3.2 リンパ球幼若化反応

#### 3.2.1 正常及び担癌脾細胞の各種リンパ球幼若化反応

Con A 刺激, MLTC 及び MLC では, 担癌 3 週脾細胞の反応性は正常脾細胞の反応性と比べ有意に低下していた. LPS 刺激では, 有意差はなかったが, 同様の傾向を示した. LPS 刺激及び MLTC において, 担癌 1 及び 2 週脾細胞の反応性が上昇する傾向が見られた (Table 1). 以上のリンパ球幼若化反応の結果から, 担癌 1-2 週の時期には免疫反応はやや亢進する傾向を示し, 担癌 3 週から免疫反応は全般的に抑制されることが示された.

#### 3.2.2 担癌 3, 4 週脾細胞の正常リンパ球幼若化反応に対する影響

正常 F344 ラット脾細胞を responder とした場合, Con A 刺激, MLTC のいずれも担癌脾細胞の濃度に依存して反応が抑制された (Fig. 3A). 一方, allogeneic

**Table 1** Reactivity of the spleen cells of 0-4 wk T9 tumor-bearing rats to Con A, LPS stimulation and in MLTC and MLC.

Time of tumor bearing(WK)	0	1	2	3
Con A stimulation	16056.0±3736.8	14545.3±2838.0	19852.3±8504.6	1996.4±794.7
LPS stimulation	1177.7±259.9	4361.3±721.7	3847.7±403.0	319.4±262.1
MLTC	1266.1±281.6	2444.3±990.5	1666.5±878.0	424.7±179.2
MLC	17069.0±1467.5	15789.0±1262.5	11474.5±4631.1	12.0±16.4

The spleen cells were seeded in triplicate at a cell concentration of  $2 \times 10^6$ /ml. Con A ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), LPS ( $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), MMC-treated T9 cells ( $4 \times 10^5$ /ml, S:R=1:5) for MLTC, MMC-treated WKAH rat spleen cells ( $1 \times 10^6$ /ml, S:R=1:2) for MLC were co-cultured for 48, 72, 96 and 96 hrs respectively, and were pulsed with  $^3\text{H}$ -thymidine for the last 4, 4, 24 and 24 hrs in the same order. The values are expressed as the mean of the difference from negative control ( $\Delta \text{cpm}$ )  $\pm$  S.D. and statistical analysis was performed with the Student's two-tailed paired t-test.

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.005$

な正常 WKAH ラット脾細胞を responder とした場合も、同様に加えた担癌脾細胞の濃度に依存した抑制効果が認められた (Fig. 3B).

### 3・2・3 正常及び担癌血清の正常リンパ球幼若化反応に対する影響

正常及び担癌 1~4 週血清を 25~0.1%濃度で正常脾細胞の Con A 刺激, MLTC 及び MLC の反応系に加えた場合, いずれの免疫反応においても, 濃度依存性の抑制効果を認めたが, 担癌時期による違いは認められなかった (Fig. 4).

## 3・3 LAK 細胞誘導及び *in vitro* 細胞障害試験

### 3・3・1 正常及び担癌脾細胞の NK 活性及び LAK 活性

K562 細胞は NK 感受性, Daudi 細胞は NK 抵抗性の細胞とされ, T9 細胞は今回の実験, 及び IL-2 の濃度を変えて LAK 細胞誘導能をみた実験<sup>10)</sup>において, LAK 細胞に対して Daudi 細胞と同様の感受性を示すことから NK 抵抗性の細胞と考えられた. LAK 活性 (IL-2(+)) は標的細胞が T9, K562 及び Daudi 細胞のいずれであっても, 担癌に伴い活性は徐々に低下し, 担癌 3 週以降では LAK 細胞はほとんど誘導されなかった. 一方培養後の NK 活性 (IL-2(-)) は, 標的細胞が K562 及び Daudi 細胞の場合には担癌の時期による一定の変化は認められなかったが, T9 細胞に対する障害活性は, 低いながらも徐々に増加する傾向を示した (Fig. 5).

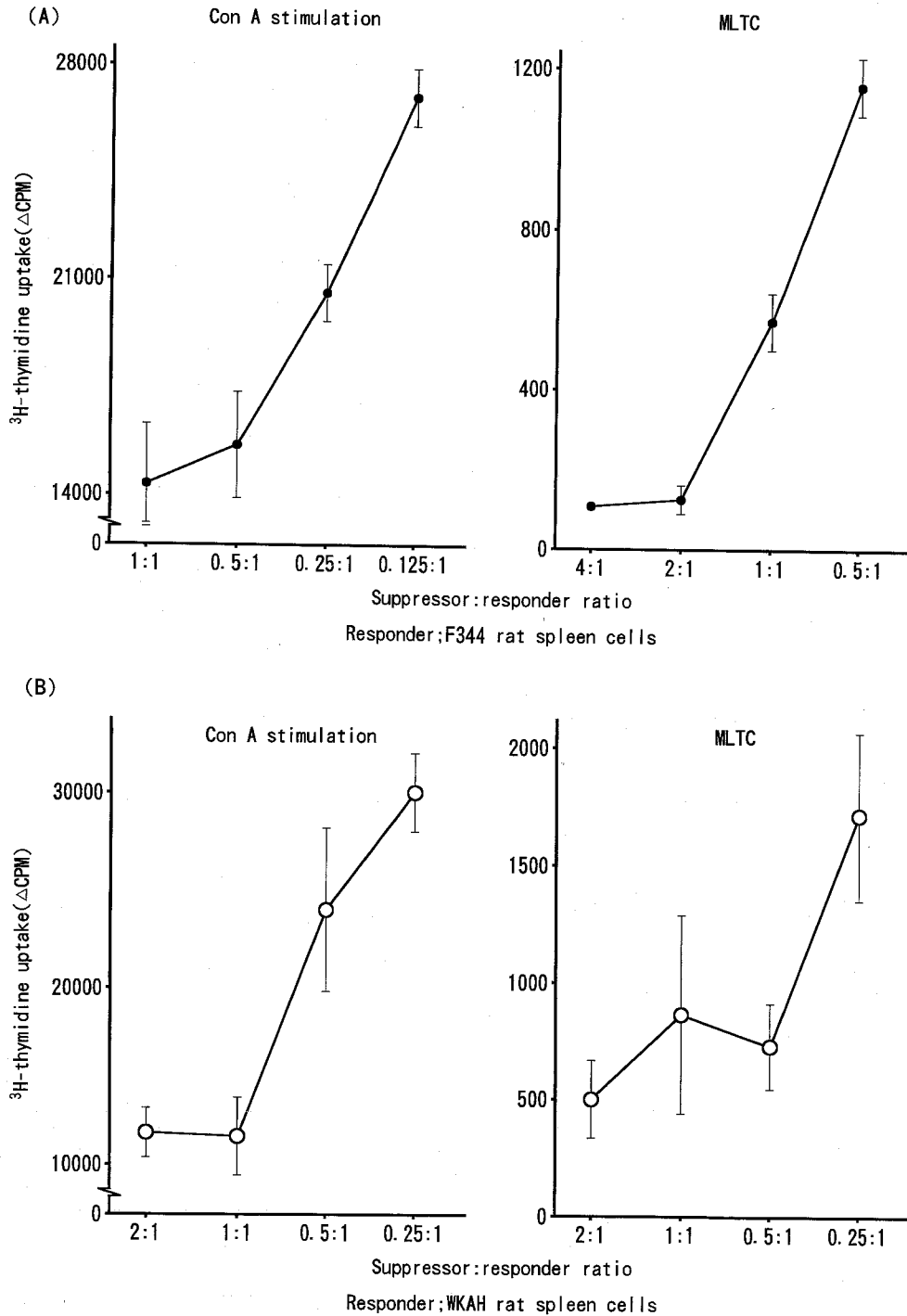
### 3・3・2 担癌 3, 4 週脾細胞の正常 LAK 活性に対する影響

正常脾細胞よりの LAK 細胞誘導の系において, LAK 細胞誘導相に担癌脾細胞, 及びコントロールとして正常脾細胞を加えた場合, いずれも加えた細胞濃度に依存して, T9 細胞に対する LAK 細胞誘導能は抑制されたが, 担癌脾細胞を加えた場合に, 有意に強い抑制が認められた (Fig. 6).

### 3・3・3 担癌 3, 4 週脾細胞各サブセットの正常 LAK 活性に対する影響

担癌脾細胞の各サブセットを LAK 細胞誘導相に加えた場合 (Fig. 7A), いずれのサブセットでも濃度依存性に正常脾細胞の LAK 活性を抑制した. 各サブセット間では adherent の抑制作用が著明で, 次いで adherent-3B3+RTH depletion に抑制作用が認められた. 一方細胞障害相に加えた場合 (Fig. 7B), 各サブセット間及び suppressor の濃度による違いは認められなかった (Fig. 7).

更に suppressor:effector 比が 2:1 の条件下で, LAK 細胞誘導相における各サブセットの抑制効果の差異を詳しく検討した (Fig. 8). T9 細胞を標的細胞とした場合 (Fig. 8A), whole 添加に比べ adherent 添加で LAK 活性が著明に低下し, adherent depletion 添加で上昇すること, adherent depletion 添加に比べ adherent-10B5 depletion 添加の方が LAK 活性が高く, adherent-3B3+RTH depletion 添加で低下することが



**Fig. 3** Suppressive effect of the MMC-treated tumor-bearing spleen cells on immunoreaction of normal spleen cells (Fig. 3A) or allogeneic WKAH rat spleen cells (Fig. 3B) to Con A stimulation or MLTC. Suppressor:responder ratio ranged from 1:1 to 0.125:1 in Con A stimulation and from 4:1 to 0.5:1 in MLTC (Fig. 3A) or from 2:1 to 0.25:1 in both Con A stimulation and MLTC (Fig. 3 B). The values are expressed as the mean of the difference from negative control ( $\Delta\text{cpm}$ )  $\pm$  S. D..

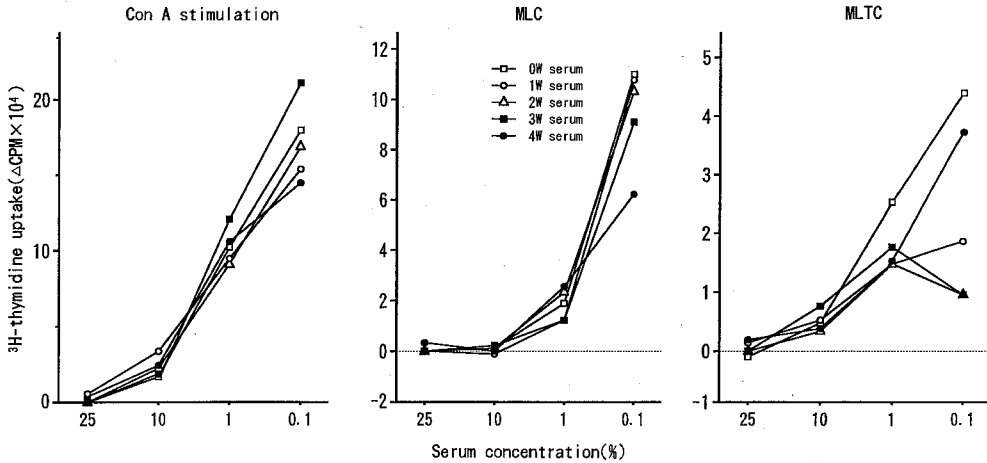


Fig. 4 Suppressive effect of the sera from 0-4 wk tumor-bearing rats on immunoreaction of normal spleen cells to Con A stimulation, MLTC and MLC. The sera were added at a concentration of 25-0.1%. Every S. D. was less than 10%.

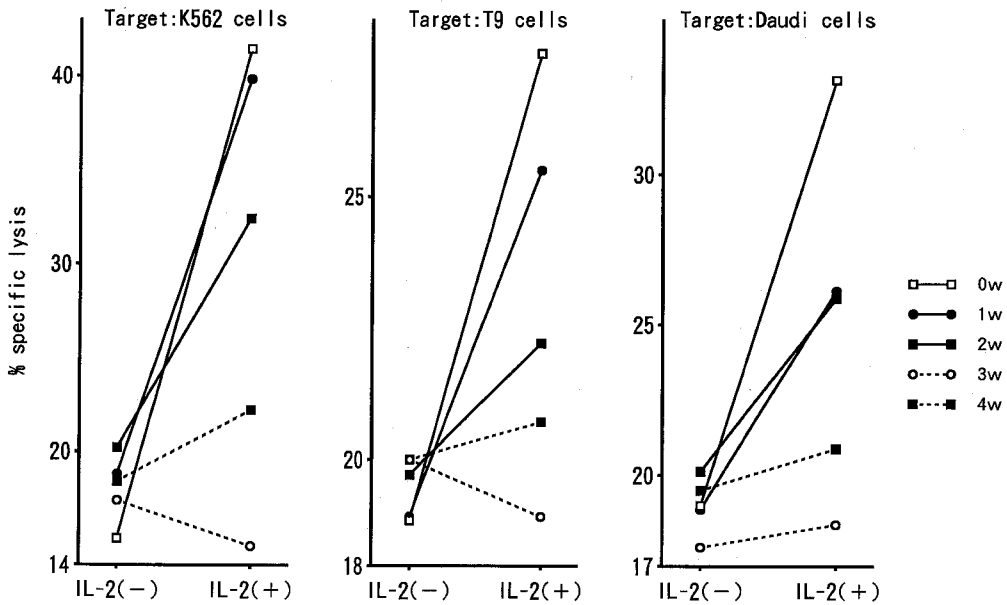
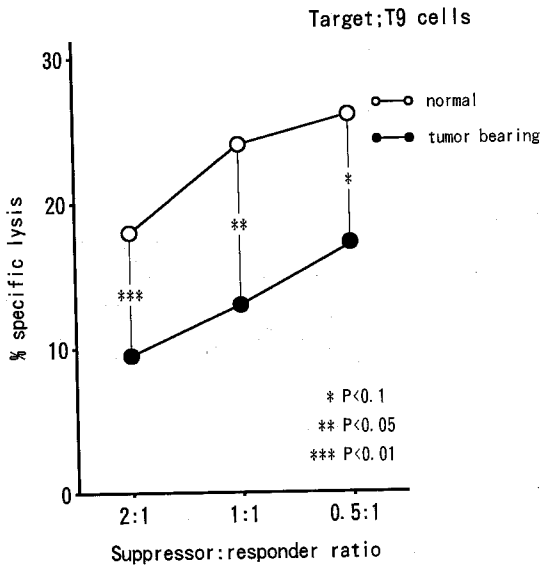


Fig. 5 LAK activity of the spleen cells of 0-4 wk T9 tumor-bearing rats against K562, T9 or Daudi cells. The spleen cells were cultured for 4 days with or without rIL-2(10U/ml) and were assessed for their cytolytic activity in a 4hr-<sup>51</sup>Cr-release assay at a E:T ratio of 100:1. The values are expressed as % specific lysis. Every S. D. is less than 10%.

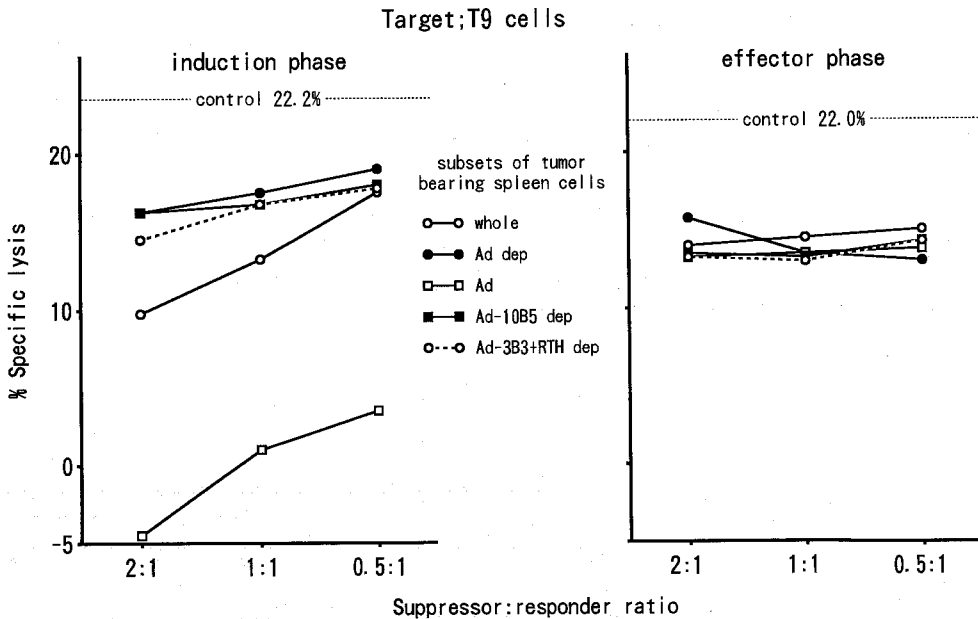
統計学的有意差をもって認められた。また, adherent-3B3 depletion 添加では有意な上昇は認められず, adherent-10B5 depletion 添加は, adherent-3B3 depletion 添加及び adherent-RTH depletion 添加に比べ活性が高かった。K562 細胞を標的細胞とした場合でも同様な傾向が認められた(Fig. 8B)。従って, 担癌

脾細胞から adherent 細胞及び CD 8(+)T 細胞を除去することにより抑制は軽減され, adherent 細胞及び CD 5(-) CD 8(+) T 細胞の濃度を高めることで抑制はより増強された。すなわち adherent 細胞及び CD 5(-)CD 8(+) T 細胞が suppressor 細胞の機能を有していると思われた。

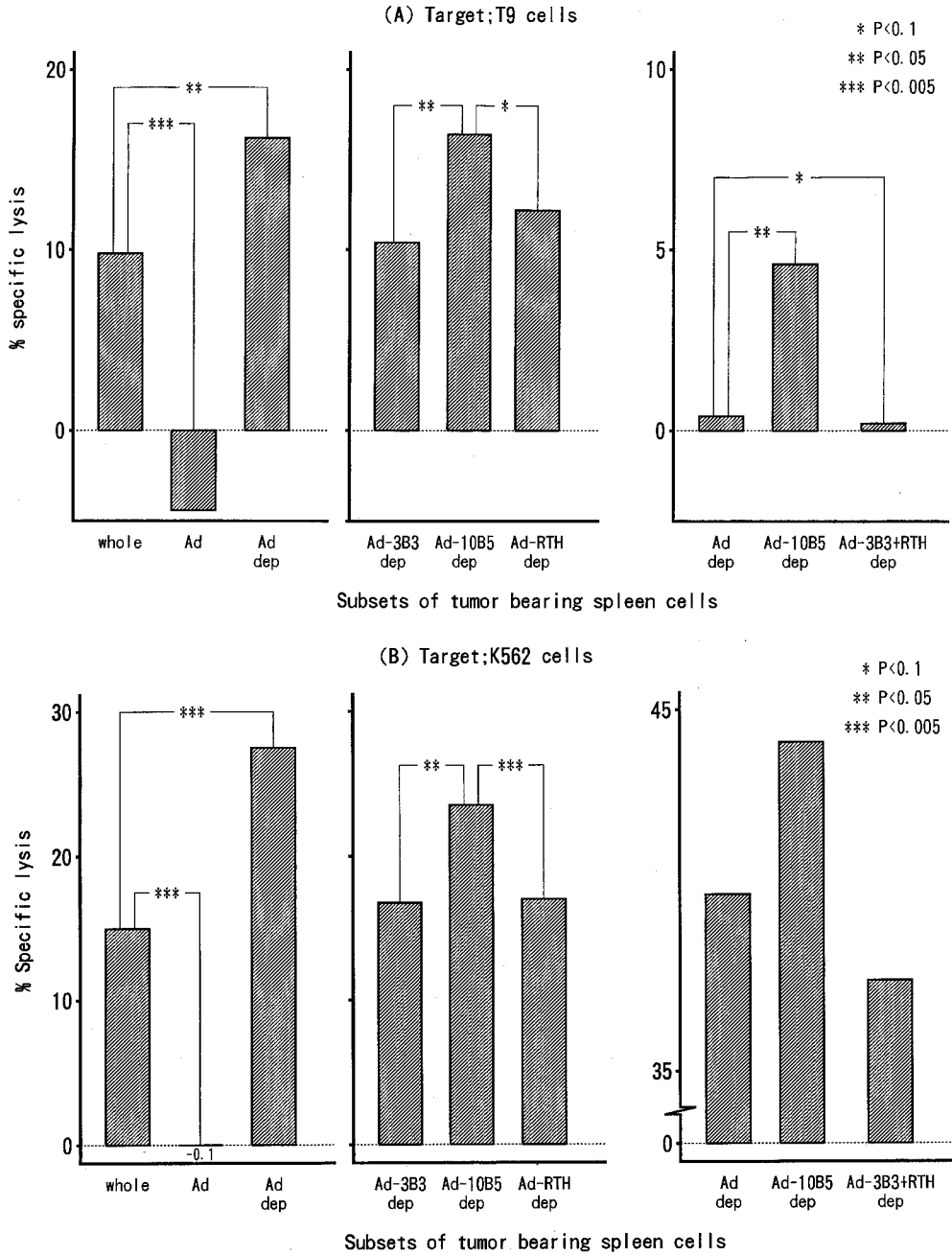




**Fig. 6** Suppressive effect of the MMC-treated normal(open circle) or tumor-bearing (longer than 3 wks) spleen cells(closed circle) on the induction of LAK cells, assessed by cytolytic ability against <sup>51</sup>Cr-labelled T9 cells. Suppressor:responder ratio ranged from 2:1 to 0.5:1. The values are expressed as %specific lysis. Every S.D. is less than 10% and statistical analysis was performed with the Student's two-tailed paired t-test.



**Fig. 7** Suppressive effect of several subsets of the MMC-treated tumor-bearing spleen cells on LAK cell induction against T9 cells. The subsets were added at induction phase(Lt. side) or effector phase(Rt. side). Suppressor:responder ratio ranged from 2:1 to 0.5:1. The values are expressed as %specific lysis. Every S.D. is less than 10%. As a control, LAK activity without addition of suppressor was tested. Whole=MMC-treated tumor-bearing spleen cells; Ad dep=adherent cells-depleted fraction; Ad=adherent cells; Ad-10B5 dep=adherent cells and CD8(+) cells-depleted fraction; Ad-3B3+RTH dep=adherent cells and CD5(+), CD4(+) cells-depleted fraction.



**Fig. 8** Different suppressive effect among several subsets of the MMC-treated tumor-bearing spleen cells on LAK cell induction against T9 cells(Fig. 8A), or against K562 cells(Fig. 8B). The subsets were added at the induction phase at a suppressor:responder ratio of 2:1. The values are expressed as %specific lysis. Every S. D. is less than 10% and statistical analysis was performed with the Student's two-tailed paired t-test. Whole=MMC-treated tumor-bearing spleen cells; Ad dep=adherent cells-depleted fraction; Ad=adherent cells; Ad-3B3 dep=adherent cells and CD5(+) cells-depleted fraction; Ad-10B5 dep=adherent cells and CD8(+) cells-depleted fraction; Ad-RTH dep=adherent cells and CD4(+) cells-depleted fraction; Ad-3B3+RTH dep=adherent cells and CD5(+), CD4(+) cells-depleted fraction.

### 3・3・4 正常及び担癌血清の正常 LAK 活性に対する影響

正常脾細胞からの LAK 細胞誘導の系において、LAK 細胞誘導相に正常及び担癌 1~3 週血清を加えた場合、標的細胞が T9 細胞、K562 細胞のいずれの場合でも、10%濃度の血清添加で明らかに担癌の時期に伴って LAK 活性は抑制された。同様の傾向は1%及び0.1%濃度の血清添加でも認められたが、血清濃度に関する依存性は認められなかった (Fig. 9)。

## 4 考 察

### 4・1 担癌に伴う免疫抑制機構についての従来報告

生体の免疫反応は、種々のサブセットからなるリンパ球やその他の免疫担当細胞が直接接触したり、サイトカインを介することにより、お互いに様々な影響を及ぼし合いながら行われている。この中で suppressor 細胞は抗原刺激に対する amplifier 細胞の過剰な反応を抑制し、特定の抗原刺激に対する免疫反応を調節することにより、ホメオスタシスを維持する役割を担っていると考えられる<sup>1)</sup>。ところが担癌時には、ホメオスタシスが崩れ、免疫抑制の方向にバランスが傾き、これが生体にとって不利な状態となる現象が認められている<sup>2,3)</sup>。担癌に伴う免疫抑制の成因やその機構につい

ては報告により結果がまちまちで、必ずしも一定の結論を導き得ないのが現状である。免疫調節機構の担い手は免疫細胞あるいはそれらにより産生される液性因子と考えられるが、担癌時には腫瘍抗原、抗原抗体結合物、または腫瘍細胞の産生する生物活性物質が関与する可能性もある<sup>6)</sup>。担癌により誘導される suppressor 細胞としては、Tリンパ球<sup>5,20-25)</sup>や Mφ<sup>25-29)</sup>の報告が多い。しかし、これらが正常時に存在する機構の、担癌による増幅であるか否かは意見の一致をみない<sup>30-33)</sup>。また、免疫抑制の様式が主要組織適合抗原 (MHC) に拘束されるか、免疫反応全般に影響するか、腫瘍抗原特異的か、細胞増殖反応のみを抑制するか、あるいはリンパ球の細胞障害性をも抑制しうるかということにおいても結果は様々である<sup>2,3,5,23,25,29-33)</sup>。一方血清中の免疫抑制因子についても数多くの報告<sup>28,34)</sup>があり、その内には IS 物質、IAP など、すでに同定されたものも存在する。このように報告により様々な結果が得られているのは、それぞれの実験系で実験動物種、腫瘍の種類、腫瘍増殖部位、suppressor 細胞の heterogeneity、suppressor 細胞や免疫抑制因子の回収法など、免疫反応に関与する様々な因子が複雑に絡み合った上で免疫反応の調節機構が働いていることによると思われる。このことがまた、各々の実験系での結果を安易に比較す

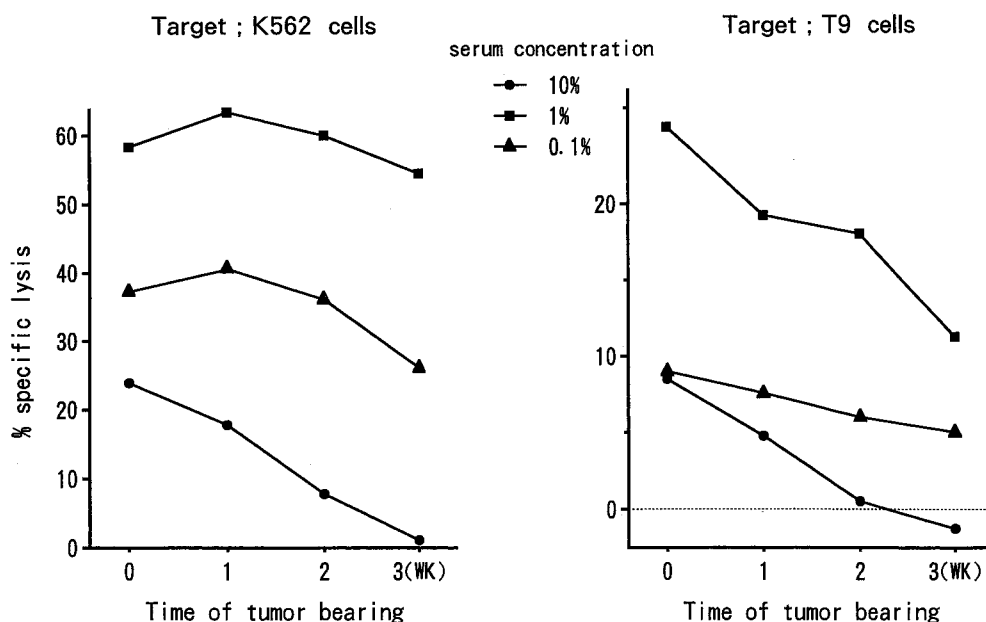


Fig. 9 Suppressive effect of the sera from 0-3 wk tumor-bearing rats on LAK cell induction against K562 cells or T9 cells. The sera were added at the induction phase at a concentration of 10-0.1%. The values are expressed as %specific lysis. Every S. D. is less than 10%.

ることを困難にしている<sup>31</sup>。我々は担癌に伴う免疫抑制現象が、近年注目を浴びている LAK 療法にいかなる影響を与え得るかを解析する目的で、T9 gliosarcoma 担癌ラットを作製し、担癌に伴う免疫反応性の変化を、その LAK 細胞に及ぼす影響を中心に検討した。

#### 4・2 suppressor 細胞

我々の用いたラットの同系腫瘍皮下移植による担癌モデルでは、担癌 3 週あるいは 4 週脾細胞の NK 活性は大きな影響を受けていないが、LAK 活性や Con A, LPS 刺激, MLTC 及び MLC のリンパ球幼若化反応がいずれも低下することを確認した。また、担癌 3 週以降、脾細胞内部に非特異的免疫抑制作用を有し、MHC に拘束されない suppressor 細胞の存在が示唆された。担癌脾細胞を各サブセットに分けることより、suppressor 細胞として少なくとも adherent 細胞及び CD 5(-) CD 8(+) T 細胞の 2 種類の細胞群が存在すると考えられた。データは示していないが、サブセットに分けた担癌 3 週あるいは 4 週脾細胞を正常の Con A 刺激, MLTC に対する反応系に加えた場合も、adherent 細胞及び CD 5(-) CD 8(+) T 細胞に有意な抑制作用を認めている。免疫抑制機能を示す Mφ, リンパ球共に、その機能の表現様式に一定の規則はないが、我々の実験系では両者の間に質的相違を認めず、レクチン刺激などによるリンパ球増殖反応を非特異的に、かつ MHC の拘束を受けずに抑制し、細胞障害活性には大きな影響を与えないタイプとみなすことができる。このことは Mφ としては、Kirshner *et al.* の実験系など比較的多く認められており<sup>26,29</sup>、また T リンパ球のタイプとしても散見することができる<sup>32</sup>。我々の系では Mφ を含む adherent 細胞により強い抑制機能を認めているが、これには CD 5(-) CD 8(+) T 細胞の population が全体の約 7% しか認められず、単クローン抗体と補体を用いた細胞除去を行っても、CD 5(-) CD 8(+) T 細胞の比率を選択的に高めることが困難なことも関与しているのかも知れない。

suppressor T 細胞の phenotype については様々な報告があるが、他の抗原性に違いがあっても CD 8(+) であるとするものが多い<sup>5,23,24,31</sup>。しかし、North and Awwad のように suppressor T 細胞として L3T4(+) (CD 4(+)) T 細胞を挙げているものもある<sup>20</sup>。担癌による免疫抑制状態の形成には一種のカスケードが存在し、suppressor T 前駆細胞がリンパ球、Mφ もしくは腫瘍細胞から分泌される誘導因子や suppressor 誘導 T 細胞により suppressor T 細胞となり、それが直接あるいは抑制因子を分泌して作用すると考えられている<sup>24</sup>。

このカスケードでは、あるものは inducer として、あるものは effector として働いているのであり、どの細胞群が suppressor として機能しているかは、その機能を評価する実験系に左右される可能性もあると思われる。

8 種類の単クローン抗体を用いた脾細胞の表面マーカーの検索では、担癌に伴う脾細胞の特定の細胞亜群の変化は認められず、脾細胞の増加は全体の population の増加によると思われた。従って adherent 細胞及び CD 5(-) CD 8(+) T 細胞の suppressor 細胞は表面形質上は変化せず、その細胞間相互作用、サイトカイン結合能、サイトカイン分泌能などの免疫反応に関する機能が変化したものと考えられた<sup>28</sup>。

我々の系では、MMC 処理した正常細胞を正常の免疫反応系に加えた場合でも、軽度ではあるが濃度に依存する抑制効果を示した。このことから担癌による免疫抑制状態は、正常時でも作動していると思われる免疫調節細胞としての suppressor 細胞の機能が亢進した状態である可能性が考えられた<sup>32</sup>。

#### 4・3 免疫抑制因子

担癌ラットの血清は、LAK 細胞誘導能に関しては濃度依存性は認めないものの、担癌の時期を経るに従って抑制効果を示したが、Con A 刺激, MLTC 及び MLC のリンパ球幼若化反応に関しては、担癌の時期に関係なく濃度依存的に抑制した。このことより LAK 細胞誘導能とリンパ球幼若化反応とは抑制の機序が異なることが考えられ、血清中に非特異的免疫抑制因子、担癌に伴う LAK 細胞誘導阻止因子など複数の免疫抑制因子が含まれる可能性があると思われた。

#### 4・4 LAK 細胞誘導能に対する担癌に伴う免疫抑制の影響

担癌患者において LAK 細胞誘導能が抑制されていることについてはいくつかの報告を見ることができる<sup>33,35</sup>。その機構として、正常な好中球が superoxide を分泌して抑制するとするもの<sup>36</sup>、ある種の腫瘍細胞もしくはその培養上清が抑制するとするもの<sup>37</sup>、正常または担癌血清が抑制するとするもの<sup>38</sup>、ある種の腫瘍の転移症例に限ってその血清が抑制するとするもの<sup>39</sup>、各種のサイトカイン (rIFN- $\gamma$ <sup>40</sup>、rIFN- $\alpha$ <sup>41</sup>)、G-TsF/TGF  $\beta$ <sup>42,43</sup>、PGE 2<sup>44</sup>) が抑制するとするものなど様々な報告がある。これらの報告は、LAK 細胞誘導能がその誘導の初期 (LAK 細胞誘導相) に抑制を受けるとする点では一致している。また多くが suppressor 細胞/抑制因子の濃度に依存して抑制を受けているとしている。今回の実験では adherent 細胞及び CD 5(-) CD 8(+) T 細胞は濃度依存的に LAK 細胞誘導相で抑制を發揮した。担

癌血清は担癌時期に平行してLAK細胞の誘導を抑制したが、濃度依存性は認められなかった。これには血清中のLAK細胞誘導阻止因子が作用しやすい至適環境がある可能性が考えられる<sup>28)</sup>。また、正常血清でもある程度のLAK細胞誘導能に対する抑制が認められたが、正常血清についても抑制作用があるとするとするものと<sup>36,38,43)</sup>、正常血清には抑制作用を認めないとするもの<sup>39)</sup>があり必ずしも一定しない。

LAK細胞誘導相が抑制を受ける事実は、suppressor細胞/抑制因子はLAK前駆細胞がIL-2の作用を受けLAK細胞へ分化する過程に作用することを示唆する。それにはsuppressor細胞/抑制因子が、1) LAK前駆細胞を除去してしまう、あるいは、2) LAK前駆細胞とIL-2との結合を妨げるなどの機序が考えられる。例えば抑制にMφが関与しておりMφの除去にて抑制が軽減するとするもの<sup>19,39,40)</sup>や、IL-2の投与量を増加することで抑制が軽減するとするもの<sup>39,43-45)</sup>は2)の機序によると思われる。今回の実験では、Mφに富んだadherent細胞に抑制作用を認めることにより、2)の機序の関与が考えられた。

## 5 要 約

ラットの同系腫瘍移植モデルを用いて、担癌による免疫抑制の形成について解析した。1) 担癌3週以降では脾細胞のLAK細胞誘導能、リンパ球幼若化反応が低下しており、全般的な免疫抑制状態が形成されていることが確認された。2) 担癌3週以降脾細胞にはsuppressor細胞が含まれており、このsuppressor細胞は非特異的かつ濃度依存的免疫抑制作用を有し、またMHCの制限を受けずに抑制作用を発揮すると考えられた。3) adherent細胞及びCD5(-) CD8(+) T細胞がsuppressor細胞である可能性が示唆された。4) 血清中に非特異的免疫抑制因子及び担癌に伴うLAK細胞誘導阻止因子が存在すると考えられた。5) LAK細胞はその誘導の初期(LAK細胞誘導相)にsuppressor細胞、血清中の抑制因子の両者より抑制を受けた。

本稿を終えるにあたり、本学病理学第1講座上出利光助教授にRTS-1及びDr. John C. Hiserodtより同氏に供与された3. 2. 3を供与して下さったことを感謝します。又図表の作製に協力して下さった当講座岡田忠氏に感謝します。

## 文 献

1. Dorf, M. E. and Benacerraf, B.: Suppressor

cells and immunoregulation. *Annu. Rev. Immunol.* **2**, 127-158 (1984).

2. Broder, S. and Waldmann, T. A.: The suppressor-cell network in cancer. *N. Engl. J. Med.* **299**, 1335-1341 (1978).
3. Naor, D.: Suppressor cells: Permitters and promoters of malignancy? *Adv. Cancer Res.* **29**, 45-125 (1979).
4. Young, H. F., Sakalas, R. and Kaplan, A. M.: Inhibition cell-mediated immunity in patients with brain tumors. *Surg. Neurol.* **5**, 19-23 (1976).
5. 吉田誠一: 悪性脳腫瘍患者における免疫抑制機構の研究. *脳神経* **37**, 1137-1143 (1985).
6. Brooks, W. H., Netsky, M. G., Normansell, D. E. and Horwitz, D. A.: Depressed cell-mediated immunity in patients with primary intracranial tumors. *J. Exp. Med.* **136**, 1631-1644 (1972).
7. Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Chang, A. E., Avis, F. P., Leitman, S., Linehan, W. M., Robertson, C. N., Lee, R. E., Rubin, J. T., Seipp, C. A., Simpson, C. G. and White, D. E.: A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* **316**, 889-897 (1987).
8. Barba, D., Saris, S. C., Holder, C., Rosenberg, S. A. and Oldfield, E. H.: Intratumoral LAK cell and interleukin-2 therapy of human gliomas. *J. Neurosurg.* **70**, 175-182 (1989).
9. 伊林至洋, 八巻稔明, 川原孝久, 大坊雅彦, 久保田司, 上出廷治, 田辺純嘉, 端和夫, 上出利光: LAK細胞を用いた悪性脳腫瘍に対する免疫療法とその問題点. *神経免疫研究* **2**, 259-265 (1989).
10. 八巻稔明, 伊林至洋, 川原孝久, 大坊雅彦, 中村徹, 田辺純嘉, 端和夫: LAK細胞の腫瘍内infusion法による脳腫瘍免疫療法の基礎的検討. *神経免疫研究* **1**, 242-249 (1988).
11. Benda, P., Sameda, K., Messer, J. and Sweet, W. H.: Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J. Neurosurg.* **34**, 310-323 (1971).
12. Matsuura, A., Ishii, Y., Yuasa, H., Kon, S., Takami, T. and Kikuchi, K.: Rat T lymphocyte antigens comparable with mouse Lyt-1 and Lyt-2, 3 antigenic systems; Characterization by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **132**, 316-322 (1984).
13. Yamaki, T., Uede, T., Sugawara, Y., Wada, T., Yamaguchi, A., Kokai, Y. and Kikuchi, K.:

- Characterization of rat T cell subset antigen by monoclonal antibody. **Microbiol. Immunol.** **31**, 793-807 (1987).
14. Ishii, Y., Matsuura, A., Iwaki, H., Takami, T. and Kikuchi, K.: Two closely related antigens expressed on granulocytes, macrophages and some reticular elements in rat lymphoid tissues; Characterization by monoclonal antibodies. **Immunology** **51**, 477-487 (1984).
  15. 名越智, 上出利光, 高見剛, 菊池浩吉: CD8(+)T細胞を2分する新しいラットリンパ球抗原の機能的解析. **Proc. Jpn. Soc. Immunol.** **19**, 152 (1989).
  16. Matsuura, A., Ishii, Y., Iwaki, H. and Kikuchi, K.: A novel cell-cell surface antigen expressed on most leukocytes and a minor cortisone resistant population of thymocytes in rats; Characterization by monoclonal antibodies. **Microbiol. Immunol.** **29**, 873-881 (1985).
  17. Mason, D. W., Arthur, R. P., Dallman, M. J., Green, J. R., Spickett, G. P. and Thomas, M. L.: Functions of rat T-lymphocyte subsets isolated by means of monoclonal antibodies. **Immunol. Rev.** **74**, 57-82 (1983).
  18. Chamber, W. H., Vujanovic, N. L., Deleo, A. B., Olszowy, M. W., Herberman, R. B. and Hiserodt, J. C.: Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adherent lymphokine-activated killer cells. **J. Exp. Med.** **169**, 1373-1389 (1989).
  19. Ibayashi, Y., Hoon, D. B. and Golub, S. H.: The regulatory effect of adherent cells on lymphokine activated killer cells. **Cell. Immunol.** **110**, 365-378 (1987).
  20. North, R. J. and Awwad, M.: T cell suppression as an obstacle to immunologically mediated tumor regression: Elimination of suppression results in regression. **Prog. Clin. Biol. Res.** **244**, 345-358 (1987).
  21. Berendt, M. J. and North, R. J.: T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity; An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. **J. Exp. Med.** **151**, 69-80 (1980).
  22. Awwad, M. and North, R. J.: Cyclophosphamide-induced immunologically mediated regression of a cyclophosphamide-resistant murine tumor: A consequence of eliminating precursor L3T4+ suppressor T-cells. **Cancer Res.** **49**, 1649-1654 (1989).
  23. Mohaghehpour, N., Damle, N. K., Takada, S. and Engleman, E. G.: Generation of antigen receptor-specific suppressor T cell clones in man. **J. Exp. Med.** **164**, 950-955 (1986).
  24. 峠哲哉, 山口佳之, 高山孝彦, 馬場信年, 家護谷泰秀, 黒井克昌, 服部孝雄: サプレッサー因子と免疫抑制細胞との関連性. **Biotherapy** **3**, 487-495 (1989).
  25. 井口進, 石井良文: 担癌ラットにおける免疫抑制の細胞性機構. **札幌医誌** **49**, 117-127 (1980).
  26. Kirchner, H., Holden, H. T. and Herberman R. B.: Inhibition of *in vitro* growth of lymphoma cells by macrophages from tumor-bearing mice. **J. Natl. Cancer Inst.** **55**, 971-975 (1975).
  27. 上出利光, 佐藤修, 井口進, 菊池浩吉: 実験的脳腫瘍における細胞性免疫抑制の機序. **脳神経外科** **9**, 503-508 (1981).
  28. 石田名香雄: 担癌動物に見られる免疫抑制の実態. **薬学雑誌** **105**, 91-108 (1985).
  29. Viet, B. C. and Feldman, J. D.: Altered lymphocyte functions in rats bearing syngeneic Moloney sarcoma tumors. **J. Immunol.** **117**, 655-660 (1976).
  30. Christensen, N. D., Kreider, J. W. and Horetsky, R. L.: Suppressor lymphokine produced by rat T-cells in response to syngeneic mammary adenocarcinoma 13762A. **Cancer Res.** **48**, 943-949 (1988).
  31. Koide, J. and Engleman, E. G.: Differences in surface phenotype and mechanism of action between alloantigen-specific CD8+ cytotoxic and suppressor T cell clone. **J. Immunol.** **144**, 32-40 (1990).
  32. Hillinger, S. M. and Herzig, G. P.: Impaired cell-mediated immunity in Hodgkin's Disease mediated by suppressor lymphocytes and monocytes. **J. Clin. Invest.** **58**, 1620-1627 (1977).
  33. Maccubbin, D. L., Mace, K. F., Ehrke, M. J. and Mihich, E.: Modification of host antitumor defense mechanisms in mice by progressively growing tumor. **Cancer Res.** **49**, 4216-4224 (1989).
  34. 高後裕, 坂牧純夫, 新津洋司郎: 非特異的体液性因子とその概要 (IAP, IS 等). **Biotherapy** **3**, 469-477 (1989).
  35. 清水恵司, 宮尾泰慶, 岡本裕, 松井豊, 生塩之敬, 津田信幸, 早川徹, 石田名香雄, 最上平太郎: グリオーマ患者におけるLAK細胞の誘導能とその抗腫瘍効果. **脳神経** **38**, 265-271 (1986).
  36. Shau, H. and Kim, A.: Suppression of lymphokine-activated killer induction by neutrophils. **J. Immunol.** **141**, 4395-4402 (1988).
  37. Guillou, P. J., Sedman, P. C. and Ramsden, C. W.: Inhibition of lymphokine-activated killer cell gen-

- eration by cultured tumor cell line *in vitro*. **Cancer Immunol. Immunother.** **28**, 43-53 (1989).
38. Bugis, S. P., Lotzova, E., Savage, H. E., Hester, J. P., Racz, T., Sacks, P. G. and Schantz, S. P.: Inhibition of lymphokine-activated killer cell generation by blocking factors in sera of patients with head and neck cancer. **Cancer Immunol. Immunother.** **31**, 176-181 (1990).
39. Itoh, K., Pellis, N. R. and Balch, C. M.: Monocyte-dependent, serum-borne suppressor of induction of lymphokine-activated killer cells in lymphocytes from melanoma patients. **Cancer Immunol. Immunother.** **29**, 57-62 (1989).
40. Chao, T. Y., Ohnishi, H. and Chu, T. M.: Indirect inhibition of generation of murine lymphokine-activated killer cell activity in splenocyte cultures by interferon-gamma. **Immunology** **70**, 116-120 (1990).
41. Tokuda, Y., Ebina, N. and Golub, S. H.: The inhibitory effect of human interferon  $\alpha$  on the generation of lymphokine-activated killer activity. **Cancer Immunol. Immunother.** **30**, 205-212 (1989).
42. Kuppner, M. C., Hamou, M., Bodmer, S., Fontana, A. and Tribolet, N.: The glioblastoma-derived T-cell suppressor factor/transforming growth factor beta2 inhibits the generation of lymphokine-activated killer (LAK) cells. **Int. J. Cancer** **42**, 562-567 (1988).
43. Grimm, E. A., Crump, W. L., III, Durett, A., Hester, J. P., Lagoo-Deenadlayan, S. and Owen-Schaub, L. B.: TGF-Beta inhibits the *in vitro* induction of lymphokine-activated killing activity. **Cancer Immunol. Immunother.** **27**, 53-58 (1988).
44. Leung, K. H.: Inhibition of human NK cell and LAK cell cytotoxicity and differentiation by PGE<sub>2</sub>. **Cell. Immunol.** **123**, 384-395 (1989).

---

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学脳神経外科 久保田 司