

## 長期培養ヒトキラーT細胞クローンの確立と自家腫瘍破壊機構の解析

佐藤 卓

札幌医科大学外科学第1講座 (主任 早坂 滉 教授)

佐藤 昇志

札幌医科大学病理学第1講座 (主任 菊地浩吉 教授)

### Clonal Analysis of Cytotoxicity of Long-term Cultured T Killer Cells against the Autologous Cancer Cells

Takashi SATO

*Department of Surgery (Section 1), Sapporo Medical College  
(Chief : Prof. H. Hayasaka)*

Noriyuki SATO

*Department of Pathology (Section 1), Sapporo Medical College  
(Chief : Prof. K. Kikuchi)*

In order to investigate the cytotoxic mechanism of human killer T cells at the clonal level against autologous tumor cells, we attempted to obtain the long-term cultured killer T cell clones with the specific cytotoxic activity in two metastatic pleural effusions from breast cancers (HMC-1 and HMC-2) and one peritoneal effusion from a pancreatic cancer (HPC-3).

At initiation of the culture, pleural exudate lymphocytes (PLEL) already demonstrated a high cytotoxicity against HMC-1 targets, but not against autologous fibroblasts and K-562. PLEL showed phenotypically OKT 3 and 8 positive. However, these PLEL cultured with recombinant Interleukin-2 (rIL-2) and stimulated by autologous mixed lymphocyte-tumor culture (MLTC) showed a relatively high cytotoxicity against some allogeneic tumor targets. By cloning both effector T cells and HMC-1 targets, a highly specific pair of  $T_{CHMC-1}$  killer clone and HMC-1-8 target clone was successfully selected. PLEL from HMC-2 showed cytotoxicity against HMC-2 targets as well as K-562. T killer clones from these PLEL also showed dual cytotoxicity at the clonal level. Peritoneal exudate lymphocytes (FEL) from HPC-3 indicated an increased potential of NK activity during *in vitro* cultivation. However, PEL were unsuccessful in selecting the killer clones from HPC-3 case possibly due to the reduced responsiveness to rIL-2.

The effector mechanism against autologous tumor cells was tested using a specific pair of  $T_{CHMC-1}$  and HMC-1-8. The cytotoxicity of  $T_{CHMC-1}$  was inhibited by the addition of OKT 3 or 8 monoclonal antibodies in the cytotoxic assays. This inhibition was recovered by the addition of Con A, suggesting that these antibodies could inhibit at the recognition phase of  $T_{CHMC-1}$  to autologous tumor cells but not at the functional phase.

With respect to the cytotoxic effect of  $T_{CHMC-1}$  against HMC-1-8 *in vivo*, we carried out a Winn assay using nude mice. Subcutaneous injections of  $T_{CHMC-1}$  and HMC-1-8 clearly resulted in a failure of tumor development even at 12 weeks after injections. Mice injected with HMC-1-8 and allogeneic T lymphocytes cultured with rIL-2 developed tumors.

Currently,  $T_{CHMC-1}$  continues to grow *in vivo* over a one year period with the presence of rIL-2 and with the stimulation of autologous MLTC. This highly specific T killer clone could be very useful for the investigations of specific destruction of autologous tumor cells by T killer cells.

(Received April 2, 1986 and accepted May 26, 1986)

**Key words:** Human killer T clone, Autologous tumor, Effector mechanism

## 1 緒 言

癌に対する生体防御機構の場として癌組織局所の果す役割は重要であり、そこへ浸潤するリンパ球は生体内における免疫防御反応の一つの表現と思われる<sup>1)</sup>。1907年 Handley<sup>2)</sup>が悪性黒色腫の腫瘍組織中に浸潤するリンパ球に着目し、その浸潤の程度と患者の予後との関係を報告して以来、それに関連した多くの報告がなされてきた。乳癌<sup>3-5)</sup>、胃癌<sup>6)</sup>、喉頭癌<sup>7)</sup>及び神経芽細胞腫<sup>8,9)</sup>などにおいてリンパ球浸潤が解析され、それらの浸潤度と予後との相関が指摘されてきた。次いで抗血清及び他の免疫学的手法でT細胞とB細胞の同定法が確立<sup>10)</sup>し、最近ではモノクローナル抗体(MoAb)の開発によってT細胞亜群の識別が可能となり<sup>11)</sup>、腫瘍内浸潤リンパ球のもつ機能的役割が推論されてきた。教室においても、ヒト乳癌<sup>12,13)</sup>、胃癌<sup>14)</sup>、口腔癌<sup>15,16)</sup>及び子宮癌<sup>17)</sup>で浸潤Tリンパ球の検討がなされている。更にIbayashi *et al.*<sup>18)</sup>によるラットのgliosarcomaにおける腫瘍内浸潤細胞障害性リンパ球の機能的解析が試みられ、腫瘍局所に浸潤したT細胞のもつ抗腫瘍活性が解析されている。一方、つい最近までbulk culturesのなかの極めてheterogeneousなT細胞で種々の活性をみていたが、recombinant Interleukin-2 (rIL-2)によりT細胞の培養、クローニングが可能となり、クローナルレベルで抗腫瘍活性も解析されようとしている。今回我々はヒト腫瘍の系において、自己の腫瘍細胞に対し、その免疫応答に最も良く関係していると考えられるtumor associated lymphocytes (TAL)のもつ細胞障害活性を検討した。rIL-2存在下でのTALのクローニングを長期間培養を行い、*in vitro*及び*in vivo*でのクローナルレベルで検討を加えた。

## 2 実験方法

### 2.1 使用細胞

#### 2.1.1 腫瘍細胞株樹立

35歳及び60歳女性の乳癌胸膜転移と67歳男性の膀胱腹膜転移後に胸水、腹水貯溜をきたした患者より穿刺吸引で採取した腫瘍細胞から、既に報告した培養方法<sup>19)</sup>を用いて培養細胞株を樹立した。すなわち、浸出液約500mlを250×g、10分間で遠沈を行い細胞成分のペレットを作製した。これを約20mlのRPMI-1640培養液中に浮遊させ、Ficoll-Conray液<sup>20)</sup>(比重1.082)30ml上に重層し1,000×g、15分間遠沈した。生細胞

を回収しPBSで3回洗浄後培養フラスコ(Costar #3275及び#3150, Costar, Cambridge, MA., U. S. A.)で10%非働化牛胎児血清(fetal calf serum, FCS)加RPMI-1640培養液で培養を開始した。培養4時間前後よりフラスコの底面に付着し始めたマクロファージ、線維芽細胞及び中皮細胞等の非腫瘍細胞を培養液交換により順次選別しつつ、浮遊液中の腫瘍細胞のみを持続的に培養した。これらの腫瘍細胞は培養開始後1カ月前後で培養フラスコの底面に付着し、安定した分裂増殖を始めた。約1週間に1度の頻度で、トリプシン(0.05% Trypsin+0.02% EDTA)処理によって継代培養を行った。乳癌由来細胞株をHMC-1及びHMC-2、または膀胱癌由来株をHPC-3と名付けた。これはいずれも軟寒天培養で高いコロニー形成能を示した。

#### 2.1.2 胸、腹水由来リンパ球(pleural exudate lymphocytes, PLEL: peritoneal exudate lymphocytes, PEL)及び末梢リンパ球(peripheral blood lymphocytes, PBL)の分離培養

PEL及びPELは、前述の採取胸、腹水中における細胞成分からFicoll-Conrayの比重遠心法によって分離した後、更にPercoll不連続密度勾配法<sup>21)</sup>により選択的に分離した。一方、PBLはペパリン加末梢血中よりFicoll-Conray比重遠心法により分離した。いずれもrIL-2(後述)存在下で、2週間に一度のautologous mixed lymphocyte-tumor cultureを繰り返しながら、30°C5%CO<sub>2</sub>培養器中、RPMI-1640培養液で培養した。

#### 2.1.3 同種腫瘍培養株

同種腫瘍標的細胞として新潟大学病理学教室、鈴木博士より供与された膀胱癌由来株PANC-1<sup>22)</sup>、HGC-25<sup>23)</sup>、肺癌由来株PC-10<sup>24)</sup>、胃癌由来株MKN-45<sup>24)</sup>、大腸癌由来株M-7609<sup>25)</sup>、また当教室で樹立した膀胱癌由来株HPC-1<sup>19)</sup>及びHPC-4を使用した。更にK-562<sup>26)</sup>、乳癌由来株ZR-75-1、同30<sup>28)</sup>を用いた。培養は10%FCS加RPMI-1640培養液を用い5%CO<sub>2</sub>培養器で行った。

### 2.2 recombinant Interleukin-2 (rIL-2)

ヒトrIL-2は味の素中央研究所と塩野義製薬株式会社より提供を受けた。HMC-1の系でPELを用いて、rIL-2加培養におけるリンパ球の増殖能を<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みにより検討し、PEL増殖に必要な

な rIL-2 の単位を求めた。すなわち、PLEL の生細胞  $1 \times 10^3$  個を RPMI-1640 培養液  $100 \mu\text{l}$  に調整し、5, 10, 20, 30 U/ml の rIL-2  $100 \mu\text{l}$  を加えた。コントロールとして rIL-2 無添加培養及び PHA  $5 \mu\text{g/ml}$  加培養を行った。培養開始時、 $0.25 \mu\text{Ci}$  の  $^3\text{H}$ -thymidine (Amersham International Ltd. Buckinghamshire England) でラベルした後、平底 96 well microtiter plate (Falcon # 3042) で培養した。24, 48, 72 時間培養後に microharvester を用いてフィルター上に洗浄回収し、liquid scintillation counter で  $^3\text{H}$  活性を測定した。

### 2.3 PLEL 及び PEL の表面マーカーの検索

培養開始前と rIL-2 加培養約 1 カ月後におけるリンパ球表面マーカーを MoAb を用いて間接蛍光抗体法で検索した。使用した MoAb は OKT 3, 4 及び 8 (Ortho Pharmaceutical Co., Raritan, NJ., U. S. A.), HNK-1 及び HLA-DR (Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA., U. S. A.) であり、二次抗体として用いた fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated goat anti-mouse Ig は当教室で作製した。

### 2.4 Autologous mixed lymphocyte-tumor culture (autologous MLTC)

24 well plate (Costar #3424) において  $1 \times 10^4$  個のマイトマイシン C 処理自家腫瘍細胞 ( $2 \times 10^5$  個/ml の腫瘍細胞を  $5 \mu\text{g/ml}$  で 45 分間処理後、PBS で 5 回洗浄) と  $1 \times 10^5$  個のリンパ球を  $37^\circ\text{C}$  で  $5\% \text{CO}_2$  培養器で 4 日間混合培養した。そののうち活性リンパ球を Percoll 不連続密度勾配法を用いて回収した。リンパ球を最終濃度 10 U/ml の rIL-2 存在下で培養した。

### 2.5 細胞クローニング

#### 2.5.1 キラー T 細胞 (cytotoxic T cell, CTL)

HMC-1 及び HMC-2 系における PLEL のクローニングは autologous MLTC 直後に限界希釈法を用いて行った。HMC-1 系では、培養開始 2 カ月後の、また HMC-2 の系では 3 カ月後の PLEL を用いた。これらリンパ球を平底 96 well, microtiter plate (Costar # 3799) へ 1 個/ $100 \mu\text{l}$ /well の割合で調整した後、最終濃度 10 U/ml の rIL-2 を加えた。約 2 週間培養後に増殖をみせたリンパ球をそれぞれ 24 well plate (Costar # 3424) へ移して培養を続け 7 クローンを得た。なお、フィーダー効果を期待して、同患者胸水中より得られた deberis を随時使用した。およそ 3 週で  $1 \times 10^4$  個に増殖したリンパ球に autologous MLTC を再度行い培養を続行した。

#### 2.5.2 樹立腫瘍細胞株 HMC-1 のクローニング

リンパ球のクローニングと同時に、HMC-1 の系で標的細胞である HMC-1 のクローニングを行った。すなわち、十分なトリプシン処理により free cell にした腫瘍細胞を tissue culture dish (Falcon #3002) へ 10 個/dish になるように調整した。増殖をみたコロニーより採取した腫瘍細胞を再び同じ方法を繰り返して HMC-1 のクローンを得た。

#### 2.6 $^{51}\text{Cr}$ を用いた細胞障害試験

菊地<sup>29)</sup>の方法に準じて、リンパ球の細胞障害活性を  $^{51}\text{Cr}$  release assay を用いて行った。すなわち、 $1 \times 10^7$  個の標的細胞 (target cell, T) をあらかじめ、 $100 \mu\text{Ci}$  の  $^{51}\text{Cr}$  sodium chromate (New England Nuclear, Boston, MA., U. S. A.) で 3 時間標識し、細胞数を調整した反応細胞 (effector cell, E) を混合した。最終容量は  $200 \mu\text{l}$  とし、U 底 96 well microtiter plate (Costar #3799) で一定時間培養した。各 well より  $100 \mu\text{l}$  の上清を採取し、遊出した  $^{51}\text{Cr}$  活性を scintillation  $\gamma$ -counter (Packard Auto-Gamma scintillation spectrometer) で測定した。spontaneous release は effector cell の代わりに培養液を、また maximum release は  $1\% \text{Nonidet P 40}$  (NP-40, Nakarai Chemical Co., Kyoto, Japan) を  $100 \mu\text{l}$  加えて求めた。% cytotoxicity は以下の式で求めた。

% Cytotoxicity

$$= \frac{\text{Experimental release} - \text{Spontaneous release}}{\text{Maximum release} - \text{Spontaneous release}} \times 100$$

なお、cold target inhibition assay に使用した hot target (T) 及び cold target inhibitor (I) は T/I 比 1:1 とし、得られた活性は以下の式で % Inhibition として求めた。

% Inhibition

$$= 1 - \frac{\% \text{Cytotoxicity with cold target}}{\% \text{Cytotoxicity without cold target}} \times 100$$

なお、すべての assay は triplicate で行われた。

#### 2.7 MoAb による CTL クローン 細胞障害機序の検討

HMC-1 の系におけるクローン化キラー T 細胞 ( $T_{\text{HMC-1}}$ ) を OKT 3, 4 及び 8 の各 MoAb で  $4^\circ\text{C}$  30 分間処理した後、自家腫瘍 HMC-1 をクローニングして得た cytotoxic sensitivity の高いクローン HMC-1-8 を加え培養した。E/T 比 50 に調整し、12 時間培養後の細胞障害活性を測定した。また同じ条件下で、最終濃度  $25 \mu\text{g/ml}$  の Con A を加えて細胞障害活性を測定し前者と比較検討した。

## 2.8 Winn 試験

マウス当り  $1 \times 10^6$  個の HMC-1-8 細胞と  $5 \times 10^7$  個の自家キラー T 細胞クローン  $T_{\text{CHMC-1}}$  の混合 PBS 液 1ml を調整し、4~6 週齢の BALB/c ノードマウス (CLEA Japan Co., Shizuoka, Japan) 5 匹の背部に皮下注射した。1 週毎に腫瘍の増殖を観察した。コントロールとして HMC-1-8 細胞のみの注射群と rIL-2 培養で増殖した他家 T 細胞を同じ E/T 比で使用した群を

検討した。

## 3 成 績

### 3.1 rIL-2 によるリンパ球の増殖

実験に使用した rIL-2 の最適効果を HMC-1 の系のリンパ球を用いて  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みにより検討した。Fig. 1 にみられるように、使用条件としては rIL-2 最終濃度 10U/ml で 48 時間培養が良好と考えられた。これはコントロールのリンパ球の約 10 倍以上の増殖を示した。したがって我々は rIL-2 濃度を 10U/ml にしリンパ球の長期培養に使用した。

### 3.2 リンパ球の表面マーカーの検討

使用した 3 つの系のリンパ球は、培養前に OKT 3+, 8+ がほぼ 100% であり、OKT 8+90% を示していた HMC-1 の系のリンパ球も 1 カ月培養後には 100% を示した。一方、OKT 4 はそれぞれの系において数% であったが培養後には発現をみとめなかった。また、NK 細胞の表面マーカーと考えられている HNK-1 については HMC-1 の系が培養当初及び 1 カ月後ともに低値を示したが、HMC-2 の系のリンパ球において 30% を示した。更に HPC-3 の系では 15% から 30% へとその population の増加をみせた。HLA-DR はいずれも培養当初より高値であり、1 カ月培養後には 100% を示した (Table 1)。

### 3.3 細胞障害活性の検索

**3.3.1** 培養 PLEL 及び PEL における細胞障害活性の最適 E/T 比及び培養時間を求めた。Fig. 2 にみられるように、HMC-1 及び HPC-3 の系における最適条件は E/T 比 100 で 12 時間培養、また HMC-2 の系においては E/T 比 50 で培養 12 時間と求められた。一方、培養 PBL に関しても同条件が最適であったが、これらは PLEL に比し活性は低値傾向を示した (Fig. 3)。

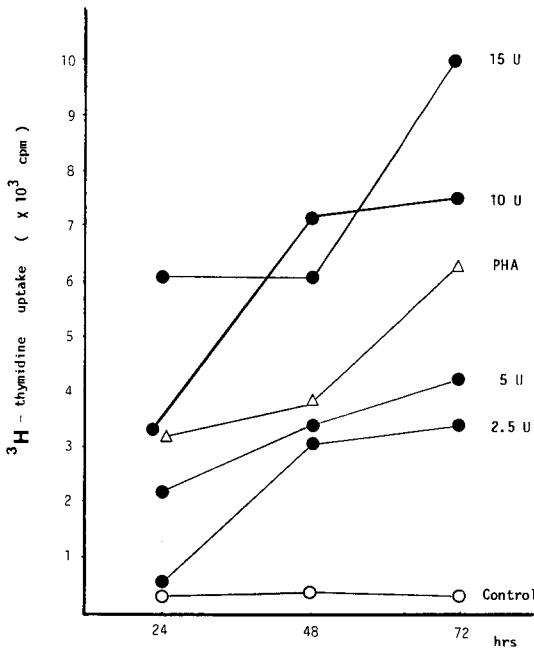


Fig. 1 The  $^3\text{H}$ -thymidine uptake of TAL in HMC-1 case cultured with various amounts (units/ml) of rIL-2. PHA was used at a concentration of  $5 \mu\text{g/ml}$ . All determinations were made in quadruplicate.

Table 1 The phenotypic analysis of TAL by MoAb.

MoAb	Culture days	Immunofluorescence % of TAL <sup>a)</sup>					
		HMC-1 <sup>b)</sup>		HMC-2		HPC-3 <sup>c)</sup>	
		0	30	0	30	0	30
OKT 3		100	100	100	100	100	100
OKT 4		6	0	2	0	4	0
OKT 8		90	100	100	100	100	100
HNK 1		8	6	30	30	15	30
HLA-DR		100	100	100	100	80	100

- a) Surface markers of TAL were tested at the initiation and after one month of culture *in vitro* by indirect immunofluorescence using saturated amounts of MoAb.  
 b) In cases of HMC-1 and HMC-2, TAL were obtained from PLEL.  
 c) TAL of HPC-3 case were PEL.

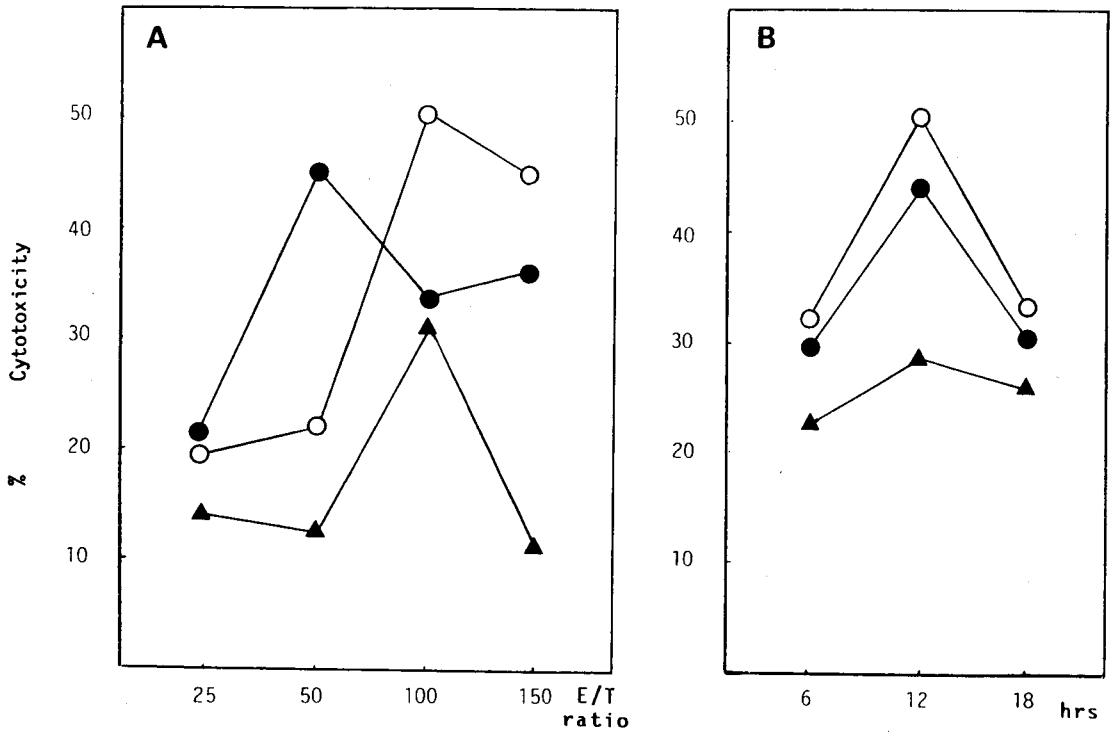


Fig. 2 The cytotoxicity of TAL against autologous tumor cells (○ HMC-1, ● HMC-2, ▲ HPC-3) with various E/T ratios (A) and at different incubation time (B).

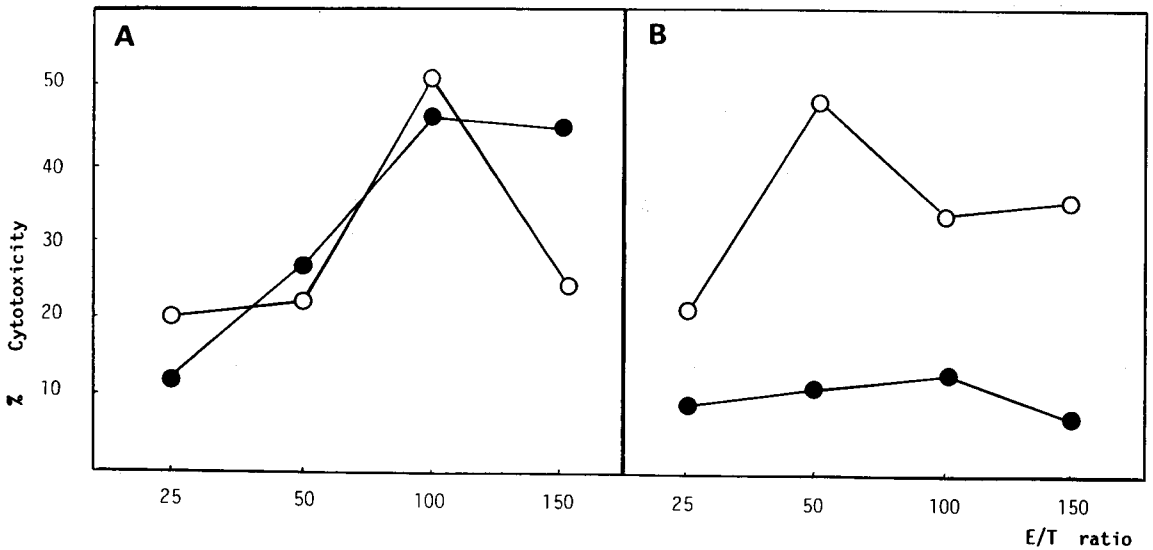


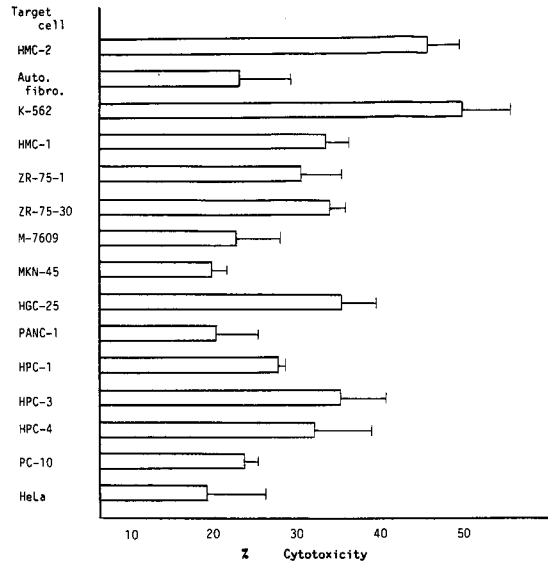
Fig. 3 The comparison on cytotoxicity of PLEL (○) and PBL (●) against the autologous tumor cells, HMC-1 (A) and HMC-2 (B), with various E/T ratios at 12 hrs incubation.

**3.3.2 培養 T 細胞の自家腫瘍及び同種腫瘍に対する細胞障害活性**

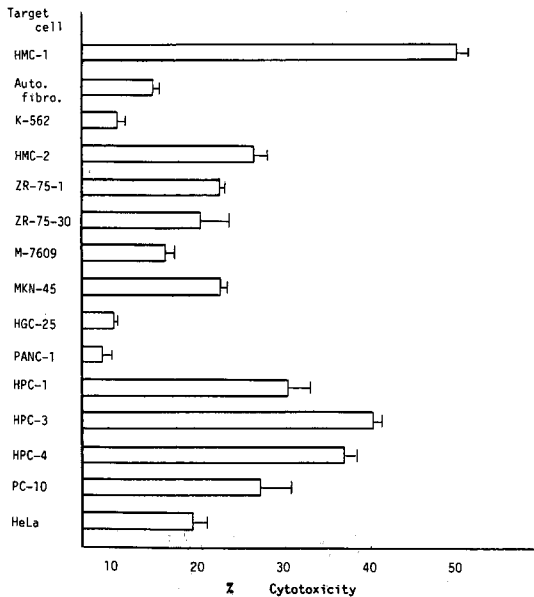
それぞれの系における自家腫瘍，自家活性を各最適培養条件下で測定した(Fig. 4, 5, 6). その結果, HMC-1 の系では明らかに自家腫瘍細胞に特異的な高い細胞障害活性が証明された. HPC-3 あるいは HPC-4 などの一部の同種腫瘍株には比較的高い活性がみられるものの自家線維芽細胞への活性は極めて低い. また同時に K-562 に対しては10%程度の低い NK 活性が得られた. 一方, HMC-2 系では K-562 と自家腫瘍細胞に比較的高い活性を示したが自家線維芽細胞及び他家腫瘍細胞にはすべて低値を示した. HPC-3 の系においては自家腫瘍細胞がわずかに高い細胞障害活性を示したが, 他のすべての標的細胞に対しては20%以下の低い活性のみ示した.

**3.3.3 培養 T 細胞の自家腫瘍細胞障害活性及び NK 活性の経時的推移**

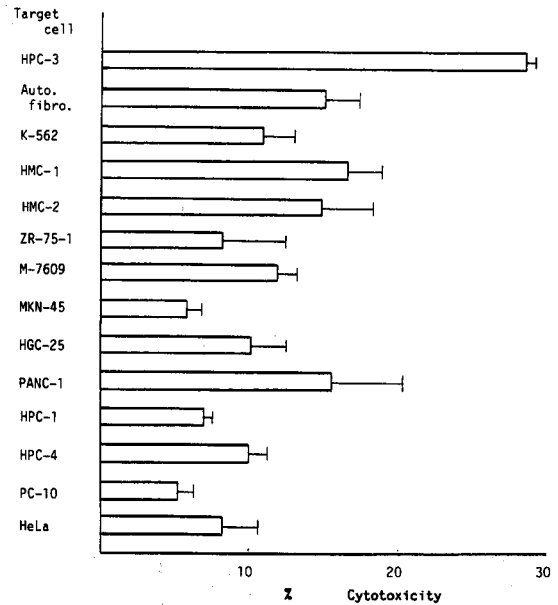
次のこれらの3つの系で, autologous MLTC を行いつつ rIL-2 存在下で培養し, 増殖した CTL の経時的細胞障害活性の変化を求めてみた. Fig. 7 にみられるように3つの系においてそれぞれ特徴的な傾向が得られ



**Fig. 5** The cytotoxicity of PLEL in HMC-2 case against various target cells. PLEL were cultured for one month and were stimulated with autologous MLTC before utilizing in cytotoxicity assays. The cultures were performed for 12 hrs at E/T ratio of 50. Bars represent mean  $\pm$  S. E. of % cytotoxicity.



**Fig. 4** The cytotoxicity of PLEL in HMC-1 case against various target cells. PLEL were cultured for one month and were stimulated with autologous MLTC before utilizing in cytotoxicity assays. The cultures were performed for 12 hrs at E/T ratio of 100. Bars represent mean  $\pm$  S. E. of % cytotoxicity.



**Fig. 6** The cytotoxicity of PEL in HPC-3 case against various target cells. PEL were cultured for one month and were stimulated with autologous MLTC before utilizing in cytotoxicity assays. The cultures were performed for 12 hrs and E/T ratio of 100. Bars represent mean  $\pm$  S. E. of % cytotoxicity.

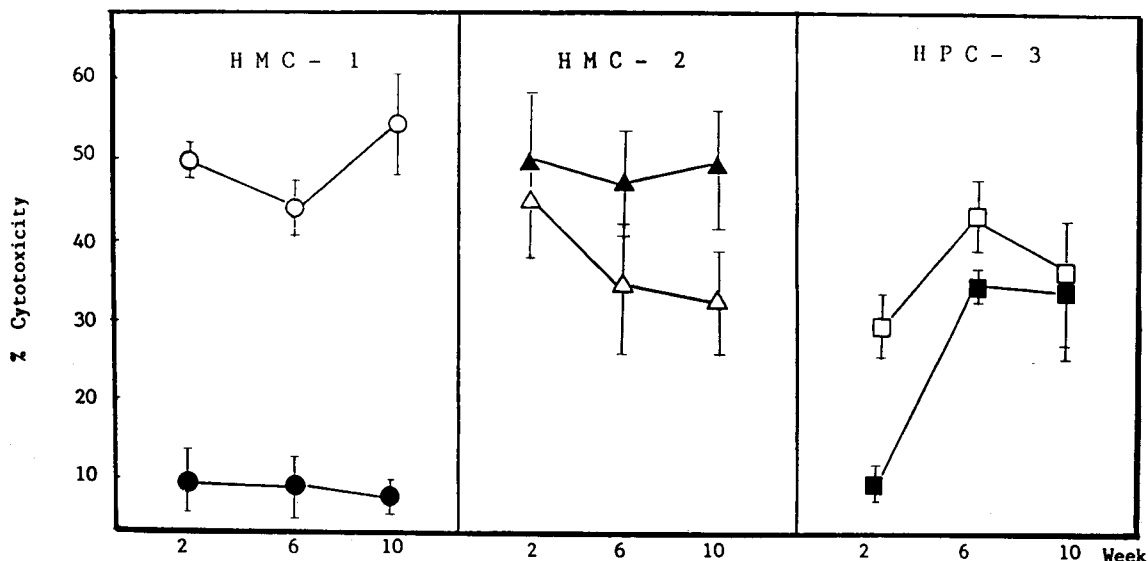


Fig. 7 The time course of cytotoxic activity of TAL against each autologous tumor cell. Open marks showed the cytotoxic activity against autologous target cell and closed marks showed against K-562. In cases of HMC-1 and HPC-3, E/T ratio was 100 and 12 hrs incubation. In case of HMC-2, E/T ratio was 50. Data were represented as % cytotoxicity  $\pm$  S. E.

た。すなわち培養10週までの活性の推移は、HMC-1の系では、当初からの低いNK活性が持続した。一方自家特異的な細胞障害活性はこの間高く維持された。HMC-2の系では高いNK活性は高値のままであるが、自家腫瘍障害活性は低下傾向をみせた。一方、HPC-3系では低いNK活性を呈したが、培養するにつれて上

昇傾向が見られ、それと共に自家腫瘍活性も上昇傾向を示した。

#### 3.3.4 CTLクローンの細胞障害活性

HMC-1及びHMC-2の系でそれぞれ培養2カ月と3カ月のTリンパ球をクローニングした。Table 2, 3に示すようにHMC-1の系においては120 well中6クロー

Table 2 Cytotoxic potential of T killer clones against autologous cancer cell, HMC-1.

Target	% Cytotoxicity <sup>a)</sup> of clone					
	1	2	3	4	5	6
HMC-1	43.4 $\pm$ 1.5 <sup>b)</sup>	30.6 $\pm$ 2.8	38.6 $\pm$ 2.5	23.9 $\pm$ 3.0	11.0 $\pm$ 1.0	29.0 $\pm$ 0.9
K-562	11.0 $\pm$ 2.3	17.6 $\pm$ 2.4	20.4 $\pm$ 6.0	17.8 $\pm$ 6.4	14.0 $\pm$ 3.4	15.1 $\pm$ 7.1

a) Cytotoxicity was measured at E/T ratio of 100 with 12 hrs incubation.

b) Data were expressed as % cytotoxicity  $\pm$  S. E.

Table 3 Cytotoxic potential of T killer clones against autologous cancer cell, HMC-2.

Target	% Cytotoxicity <sup>a)</sup> of clone						
	1	2	3	4	5	6	7
HMC-2	54.9 $\pm$ 4.3 <sup>b)</sup>	56.2 $\pm$ 4.7	44.4 $\pm$ 7.3	41.2 $\pm$ 15.0	45.0 $\pm$ 3.8	38.5 $\pm$ 3.0	52.2 $\pm$ 2.0
K-562	45.1 $\pm$ 5.7	36.5 $\pm$ 2.8	28.9 $\pm$ 1.1	53.9 $\pm$ 5.2	44.7 $\pm$ 5.8	44.8 $\pm$ 3.7	37.4 $\pm$ 3.7

a) Cytotoxicity was measured at E/T ratio of 50 with 12 hrs incubation.

b) Data were expressed as % cytotoxicity  $\pm$  S. E.

ン, また HMC-2 の系では 480 well 中 7 クローンが得られた。それぞれ E/T 比 100, 50, 12 時間培養で細胞障害活性を検討した。HMC-1 系では No. 1 のクローンに高い活性が得られ,  $T_{\text{HMC-1}}$  と命名した。一方 HMC-2 系では高い NK 活性と共に, 様々な自家腫瘍細胞障害活性を有するクローンが得られた。HPC-3 の系における T リンパ球のクローニングを数回試みたにもかかわらずリンパ球の増殖が極めて不良で, T 細胞クローンを得ることはできなかった。

### 3.3.5 樹立腫瘍細胞株 HMC-1 クローンの細胞障害感受性

T リンパ球の細胞障害活性は 10 週以降は, 培養するに従いその活性の低下を認めたため, キラー T 細胞のクローニングに加え標的細胞のクローニングも HMC-1 の系で試みた。HMC-1 の継代 23 代目において single cell cloning と 2 度行い, 8 つの HMC-1 クローンを得た。これらを HMC-1-1 より HMC-1-8 とし, それぞれの細胞障害感受性を測定した。 $T_{\text{HMC-1}}$  クローンをエフェクターとした場合は HMC-1-7 に低く, HMC-1-8 に高い細胞障害感受性を認めた (Table 4)。

### 3.3.6 Cold target inhibition assay

上記 3 つの系に対する CTL の活性が, 用いた標的細胞固有の脆弱性に起因することを除外するために, いくつかの cold target を使用して細胞障害活性の特異性を検討した (Table 5)。まず HMC-1 の系において, T リンパ球培養 1 カ月後 CTL の特異活性を, cold target として HPC-3 を使用した場合には 46% の抑制効果が得られた。また同様に培養 1 カ月後の HMC-2 の系の CTL では 82% もの高い抑制率がみられた。更に HPC-3 の系においては HMC-1 を cold target とした場合は 45% の抑制率であった。一方, HMC-1 の系の CTL のクローニングより得られた  $T_{\text{HMC-1}}$  を用いた場合, HPC-3, CPC-4 あるいは K-562 を cold target として用いても低い抑制率しか認められなかった。このことは  $T_{\text{HMC-1}}$  の活性に極めて高い特異性を示すものであり, 逆にクローニング前の T リンパ球には heterogeneous なキラー T 細胞の存在が示唆された。

### 3.3.7 MoAb による $T_{\text{HMC-1}}$ 細胞障害機序の解析

キラー T 細胞及び標的細胞相方のクローニングにより得られたキラー T 細胞クローン  $T_{\text{HMC-1}}$  と自家腫瘍

Table 4 Cytotoxic sensitivity of HMC-1 target clones by  $T_{\text{HMC-1}}$  killer clone.

Clone No.	1	2	3	4	5	6	7	8
% Cytotoxicity <sup>a)</sup>	44.0±9.8 <sup>b)</sup>	52.6±4.8	39.0±4.7	47.3±2.8	47.3±2.5	36.5±4.1	29.2±5.4	68.0±8.3

a) HMC-1 target cells were cloned at 23 th passage. Cytotoxicity was measured by <sup>51</sup>Cr release assay at E/T ratio of 100 with 12 hrs incubation.

b) Data were expressed as % cytotoxicity ±S. E.

Table 5 Cold target inhibition assay by cloned and non-cloned effector cells against autologous cancer cells.

Effector cell	Target cell	Third party cell	% Inhibition
PLEL of HMC-1 <sup>a)</sup>	HMC-1	HPC-3 <sup>b)</sup>	46.6 <sup>c)</sup>
		HMC-1	55.6
PLEL of HMC-2	HMC-2	HPC-3	82.2
		HMC-2	45.8
PEL of HPC-3	HPC-3	HMC-1	45.5
		HPC-3	53.8
$T_{\text{HMC-1}}$ clone	HMC-1-8	HPC-3	2.6
		HPC-4	10.7
		K-562	20.8
		HMC-1-8	55.3

a) Effector cells were TAL which have been cultured with IL-2 over one month.

b) Unlabeled (cold) target cells were used as the same number as hot targets.

c) Cytotoxicity was measured by <sup>51</sup>Cr release assay at effector/hot target/cold target ratios of 50:1:1 with 12 hrs incubation and the values were expressed as % inhibition.



Table 6 Inhibition assay of MoAb binding to  $T_{CHMC-1}$ <sup>a)</sup>

MoAb Treatment	% Cytotoxicity		
		Con A <sup>b)</sup>	
		(-)	(+)
OKT 3	3	26.2±1.8 <sup>c)</sup>	42.3± 0.3
OKT 4	4	44.4±2.4	49.8±11.5
OKT 8	8	20.1±6.8	46.4± 0.2
Medium		48.2±3.8	52.6± 8.2

a)  $T_{CHMC-1}$  treated by MoAb under 4°C for 30 min were cultured with <sup>51</sup>Cr labeled HMC-1-8 for 12 hrs at E/T ratio of 50:1.

b) Con A was used at a final concentration of 25μg/ml.

c) Data were expressed as % cytotoxicity ±S. E.

細胞クローン HMC-1-8 のペアを用いて、その細胞障害機構を検討した。OKT 3, 4 及び 8 をこのペアに加えると、Con A 非添加では OKT 3 及び 8 に抑制がかかり、Con A 添加によって、その抑制の消失をみた (Table 6)。すなわち、 $T_{CHMC-1}$  の細胞障害活性は OKT 3 及び 8 によって抗原の recognition phase ほど阻止されるが、function そのものはこれらの MoAb により阻止されないことを示唆した。

### 3-3-8 Winn 試験

*In vitro* で高い自家腫瘍障害活性を示す  $T_{CHMC-1}$  が *in vivo* で有効か否かをヌードマウスを用いて検討した。 $T_{CHMC-1}$  は *in vivo* においても自家腫瘍細胞クローン HMC-1-8 に対して強い抗腫瘍性を示した (Fig. 8)。HMC-1-8 のみのコントロール群が 9 週の時点において 5 匹中すべてに腫瘍発現をみたにもかかわらず、 $T_{CHMC-1}$  投与群では 12 週を経過しても腫瘍の発現率は 0% であった ( $P < 0.004$ )。一方、allogeneic な CTL を加えたヌードマウスの腫瘍発現率は 12 週の時点で 80% であり、腫瘍細胞のみの有意差をみなかった。

## 4 考 察

ヒトにおける腫瘍特異抗原とそれを認識した腫瘍細胞を破壊に導く自己キラー T 細胞との複雑な免疫反応は、末梢リンパ球、所属リンパ節、脾臓及び腫瘍内浸潤リンパ球などを用いて検索されてきた。特に腫瘍細胞に直接反応していることが強く示唆される腫瘍内浸潤リンパ球は古くから注目されてきた。つまりこれらは腫瘍に対する生体防御機構における免疫担当細胞と考えられており、高い抗腫瘍活性がいくつかの動物実験で証明されている<sup>18,30</sup>。一方、腫瘍抗原に感作された自己 T リンパ球を生体に戻す adoptive immunotherapy の概念がある<sup>31</sup>。1976 年 Morgan ら<sup>32</sup> の IL-2

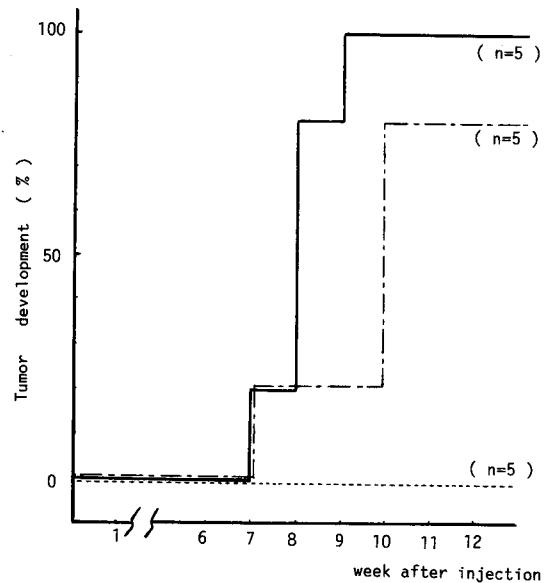


Fig. 8 *In vivo* anti-tumor effect of  $T_{CHMC-1}$  clone. A mixture (.....) of  $1 \times 10^6$  HMC-1-8 and  $5 \times 10^7$   $T_{CHMC-1}$  was subcutaneously injected in the back of nude mice. Another group of mice were injected with a mixture (-----) of allogeneic T cells cultured in the presence of IL-2 and HMC-1-8 at the same ratio, or HMC-1-8 alone (——). The tumor development was observed at weekly interval. P value in mice injected with autologous mixtures was  $< 0.004$  as determined by Fisher's exact probability test.

の発見により T 細胞の培養増殖が可能となり、自己キラー T 細胞を用いた癌治療の試みも多く報告されている<sup>18,33-36</sup>。また rIL-2 開発後は、Rosenberg ら<sup>37</sup> は主に lymphokine-activated killer (LAK) cell での顕著な有効例を報告している。しかし、ヒトにおいて細胞障害活性を十分に保持した自家腫瘍特異的キラー T 細胞クローンを得るのは必ずしも容易ではない。しかも一度に大量のリンパ球を得る一定の方法はまだ確立されていない。IL-2 を用いた自家腫瘍特異的キラー T 細胞の培養については、腫瘍局所または所属リンパ節などから得られたリンパ球や PBL を用いて検討がなされている<sup>38-41</sup>。この場合重要な点は、CTL の採取が容易であるか否かという点、すなわち、生細胞のまま、しかもできるだけ多量の CTL が、腫瘍抗原感作を受けて強い抗腫瘍細胞活性を保持したまま採取され得るかどうかにあると思われる。つまり Uchida<sup>42</sup>、後藤ら<sup>43</sup> が報告しているように、腹水からは比較的容易にリンパ球のみを単独分離することが可能である。またこれらの T 細胞は PBL、所属非転移リンパ節に比べ、既に *in*

*vivo* において持続的な autologous MLTC の状態にあると考えられる。我々は体腔液中に浸潤する T 細胞のもつ免疫学的実験モデルとして、胸水、腹水よりヒト自家腫瘍細胞と CTL の両者の長期培養系の確立を試みた。またクローナルレベルでのエフェクター機構を解析した。

CTL の長期培養、とりわけ高い腫瘍特異性を有するキラー T 細胞クローンの確立は、均一なヒト rIL-2 の開発によってしても必ずしも容易ではない。マウスの系においてはいくつかの報告<sup>37,44-46</sup>がみられるが、ヒトにおける長期培養成功例は少ない。De Vries<sup>47</sup>らはメラノーマの自家腫瘍の系で、注意深い CTL クローニングで得られたクローン化 T 細胞を用いて、その作用を解析している。彼らは、キラー T 細胞クローンにより認識される腫瘍細胞上の抗原は、MHC 抗原とは異なるものであると報告している。Spits ら<sup>48</sup>は EBV-transformed 自己 B 細胞に対する特異的キラー T 細胞クローンの活性化を、一定期間保持させることに成功している。Yssel ら<sup>49</sup>はリンパ腫の系で MLTC を反復することによって、自家腫瘍に対する特異的な細胞を得ることに成功している。Vose と White<sup>50</sup>が確立したキラー T 細胞クローンが、*in vitro* においては自分腫瘍細胞に対してのみ障害活性を示し、自己リンパ芽球あるいは K-562 細胞などの非自家腫瘍に対しては全く活性を示さないことを報告している。更に Mukheriji ら<sup>51</sup>は、メラノーマ患者で腫瘍細胞と末梢 T リンパ球との間の one-way WLTC で刺激を受けて得られた CTL は、自家腫瘍のみならず、同種メラノーマ及び他の腫瘍細胞株にも広い障害活性を示すと報告した。その CTL を MLTC で刺激しながら限界希釈法によりクローン化すると自家腫瘍のみに特異的な反応をもつクローンが得られたことを示した。しかし、これらの種々のクローンが培養開始後どのくらいの期間持続的に高い細胞障害活性を有したのか、あるいは IL-2 存在下でのそのクローンの増殖性に関しては不明である。我々の確立した乳癌患者由来のクローン化キラー T 細胞 T<sub>CHMC-1</sub><sup>52</sup>は、自家腫瘍細胞クローン HMC-1-8 に対して特異的に高い細胞障害活性を保持しつつ、1 年以上にわたり *in vitro* で増殖を示している。このような長期培養 T キラークローンは現在まで報告がない。我々はこのクローンを用いてキラー T 細胞の抗原認識及びその破壊機構に若干の解析を加えた。自家腫瘍細胞に対して誘導された CTL はマウスでは Lyt 1+, 2+, ヒトにおいては OKT 3+, 4-, 8+ の表面形質を示すものが主体である<sup>53</sup>。これらの CTL は腫瘍特異性と共に

MHC 拘束性を示すが、なかでも Class I (HLA-A, B, C) 抗原に拘束されるものが多く見出されている。allogeneic CTL やウイルス感染細胞に対する CTL でみられるような Class II (HLA-DR) 抗原に拘束された Lyt 1+, 2-, あるいは OKT 3+, 4+, 8- の形質を示す腫瘍特異的 CTL の報告は比較的少ない。

autologous の EBV-transformed B 細胞に対する Meuer<sup>53,54</sup> らの CTL は、自己の MHC 及び EB virus 関連抗原の両者を認識する。そして OKT 8, OKT 4 抗原はそれぞれ Class I 及び Class II の認識に参与した抗原であることが確認された。我々の T<sub>CHMC-1</sub> を用いた解析では、OKT 3 及び OKT 8 の存在下にて細胞障害活性の明らかな抑制がみられた。また、Con A を加えることによりこの抑制はいずれも解除された。このことは OKT 3 あるいは 8 の各々の MoAb が T<sub>CHMC-1</sub> の腫瘍抗原認識のレベルでその作用を阻止するが、T<sub>CHMC-1</sub> のキラー活性そのものは阻止されていないことを示すものである。また OKT 8 により T<sub>CHMC-1</sub> の活性が阻止されたことは、この系における MHC Class I 抗原による拘束性を示唆している。しかし、自家線維芽細胞は障害されないことから、T<sub>CHMC-1</sub> の OKT 8 により認識される HMC-1-8 上の抗原そのものが target structure となっている可能性は否定的であるように思われる。つまりこの系においては、MHC Class I 拘束性のもとに T<sub>CHMC-1</sub> 上に存在する clonotypic な T 細胞抗原レセプター (Ti) が、HMC-1-8 上の腫瘍抗原を認識している可能性が高い。一方、De Vries らにより得られた自己メラノーマ特異的な T クローンは、MHC Class I 拘束性には全く関係していないことが報告されており、我々の系と強い対比をなしている<sup>47</sup>。T<sub>CHMC-1</sub> により認識される抗原は、動物で既に確認されている腫瘍細胞上の、いわゆる foreign MHC antigen<sup>55</sup> 可能性も否定はできない。いずれにしても T<sub>CHMC-1</sub> 上の Ti 分子、及び HMC-1-8 の腫瘍抗原の詳細な解析がその解答を与えてくれると思われる。

T<sub>CHMC-1</sub> は *in vitro* で持続的に高い細胞障害活性を示した。しかもヌードマウスを用いた *in vivo* の検索で、T<sub>CHMC-1</sub> の抗腫瘍効果が確められた。T<sub>CHMC-1</sub> の確立は、ヒトの自家腫瘍において、クローナルレベルで強いキラー活性をもつ T 細胞が生体内で確実に働いていたことを示唆するものである。しかもこれらのリンパ球は注意深い培養を経ることにより *in vitro* で増殖可能であることを示している。このことは癌患者での特異的キラー T 細胞クローンを用いた adoptive immunotherapy の可能性を大きく拓くものと思われる。

## 5 結 論

ヒト自家腫瘍におけるキラーT細胞の腫瘍細胞破壊機構をクローン化キラーT細胞を用いて検索した。

1) 胸膜あるいは腹膜転移患者の胸水、腹水中より得られたTALのキラー活性を検索すると、自家腫瘍に特異的に高い細胞障害活性を有するものがみられた。しかもこのリンパ球のクローニングにより更に高い細胞障害活性を持つクローン $T_{CHMC-1}$ が得られた。このクローンはantologous MLTCを繰り返しつつ、rIL-2の存在下で一年以上の安定した長期培養と機能保持が可能であった。

2) 同時に腫瘍細胞のクローニングにより、 $T_{CHMC-1}$ に高い細胞障害感受性を示すHMC-1-8腫瘍細胞クローンを得た。

3) 一方、培養当初あるいは培養を経過した後に高いNK活性を示すTALも、乳癌患者胸水と肺癌患者腹水より得られた。クローニングを行なったが、NK活性と自家腫瘍破壊のdual activityを示すクローンも存在した。

4)  $T_{CHMC-1}$ によるHMC-1-8の自家腫瘍細胞破壊はMoAb OKT 3及び8により阻止された。これは $T_{CHMC-1}$ による抗原認識のレベルでの阻止であり、障害機能そのものは阻止されないことが示唆された。

5)  $T_{CHMC-1}$ はヌードマウスを用いたWinn試験でも明らかに高い自家癌細胞障害活性を示した。

6) 自家腫瘍に特異的なキラーT細胞クローンによる免疫療法への可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり御指導と御校閲をいただいた外科学第一講座の早坂 滉教授並びに病理学第一講座の菊地浩吉教授に深謝いたします。また研究に際して御指導をいただいた小柴博文博士、腫瘍細胞及びリンパ球等を御提供下さった浅石和昭、岡崎 稔両博士に謝意を表します。

なお、本研究の一部は文部省特定研究であるバイオサイエンスの進展に基づくがんの重点研究基金により行われ、本論文の要旨の一部は第14回日本免疫学会、第44回日本癌学会及び第85回日本外科学会で報告した。

## 文 献

- 菊地浩吉： 癌組織におけるリンパ球浸潤の臨床的意義。日臨外会誌 **40**, 1-6 (1979).
- Handley, W. S.: The pathology of melanotic growths in relation to their operative treatment. *Lancet* **1**, 929-933 (1907).
- Moore, O. S. Jr. and Foote, E. W. Jr.: The relatively favorable prognosis of medullary carcinoma of the breast. *Cancer* **2**, 635-642 (1949).
- Bloom, H. J. G. and Field, J. R.: Impact of tumor grade and host resistance on survival of women with breast cancer. *Cancer* **28**, 1580-1589 (1971).
- Berg, J. W.: Inflammation and prognosis in breast cancer; A search for host resistance. *Cancer* **12**, 714-720 (1959).
- Black, M. M., Opler, S. R. and Speer, F. D.: Microscopic structure of gastric carcinomas and their regional lymph nodes in relation to survival. *Surg. Gynec. Obstet.* **98**, 725-734 (1954).
- Bennett, S. H., Futrell, J. W., Roth, J. A., Hoye, R. C. and Ketcham, A. S.: Prognostic significance of histologic host response in cancer of the larynx or hypopharynx. *Cancer* **28**, 1255-1265 (1971).
- Martin, R. F. and Beckwith, J. B.: Lymphoid infiltration in neuroblastomas: Their occurrence and prognostic significance. *J. Pediatr. Surg.* **3**, 161-164 (1968).
- Lauder, I. and Aherne, W.: The significance of lymphocytic infiltration in neuroblastoma. *Br. J. Cancer* **26**, 321-330 (1972).
- Kikuchi, K., Ishii, Y. and Koshiba, H.: Identification of human T and B Lymphocyte-specific antigens. In: Topics of hematology, Seno, S., Takaku, F. and Irino, S., eds., 193-196, *Excerpta Medica Amsterdam* (1977).
- 菊地浩吉： リンパ球表面抗原の解析とその応用。日病会誌 **72**, 3-28 (1983).
- Shimokawara, I., Imamura, M., Yamanaka, N., Ishii, Y. and Kikuchi, K.: Identification of lymphocyte subpopulations in human breast cancer tissue and its significance: An immunoperoxidase study with anti-human T- and B-cell sera. *Cancer* **49**, 1456-1464 (1982).
- 白井朋明, 下川原出, 平田公一, 江端俊彰, 浅石和昭, 早坂 滉, 笠井 潔, 平塚博義, 小柴博文, 今村正克, 菊地浩吉： 乳癌組織内浸潤T細胞と予後との関係。癌の臨床 **29**, 981-986 (1983).
- 笠井 潔, 今村正克, 平塚博義, 白井朋明, 神谷博文, 室谷光三, 成松英明, 水無瀬昂, 戸塚守夫, 菊地浩吉： ヒト胃癌組織に浸潤するT細胞およびT細胞亜群の免疫組織学的検索。癌の臨床 **29**, 981-986 (1983).

15. Hiratsuka, H., Imamura, M., Kasai, K., Kamiya, H., Ishii, Y., Kohama, G. and Kikuchi, K.: Lymphocyte subpopulations and T-cell subsets in human oral cancer tissue: Immunohistologic analysis by monoclonal antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.* **81**, 464-470 (1984).
16. Hiratsuka, H., Imamura, M., Ishii, Y., Kohama, G. and Kikuchi, K.: Immunohistologic detection of lymphocyte subpopulations infiltrating in human oral cancer with special reference to its clinical significance. *Cancer* **53**, 2456-2466 (1984).
17. 菊地浩吉: 癌組織におけるリンパ球浸潤の臨床的意義. *外科診療* **24**, 1839-1842 (1982).
18. Ibayashi, Y., Uede, T., Uede, T. and Kikuchi, K.: Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors: Differential cytotoxicity of mononuclear cells from tumors of immune and nonimmune rats. *J. Immunol.* **134**, 648-653 (1985).
19. Sato, T., Sato, N., Takahashi, S., Koshiha, H., Usui, T., Hirata, K., Shiramatu, K., Hayasaka, H. and Kikuchi, K.: Establishment and characterization of a human pancreatic cancer cell line (HPC-1). *Tumor Res.* **20**, 33-41 (1985).
20. 辻 公美: 比重遠沈法によるリンパ球の分離, Conray 400-Ficoll 法. *免疫実験操作法 A*, 443-446 (1975).
21. Gutierrez, C., Bernabe, R. R., Vega, J. and Kreisler, M.: Purification of human T and B cells by a discontinuous density gradient of percoll. *J. Immunol. Methods* **29**, 57-63 (1979).
22. Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M. and Todaro, G.: Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int. J. Cancer* **15**, 751-747 (1975).
23. Akagi, T. and Kimoto, T.: Establishment and characteristics of a human pancreatic cancer cell line (HGC-25). *Acta Pathol. Jpn.* **27**, 51-58 (1977).
24. 内藤誠二, 金城 満, 甲賀 新, 岡 一成, 田中健蔵, 大量章一, 早田義博, 安元公正: 培養人癌細胞の凝固線溶活性とヌードマウスにおける増殖に関する検討. *癌と化学療法* **5(Suppl.)**, 89-95 (1978).
25. 町言清朗, 石岡 隆, 高嶋一敏, 西川鼎二, 福島松郎, 石川義信: 人悪性腫瘍細胞の培養. *癌と化学療法* **6**, 265-273 (1979).
26. Lozzio, C. B. and Lozzio, B. B.: Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive philadelphia chromosome. *Blood* **45**, 321-334 (1975).
27. Gey, C., Coffman, W. and Kubicek, M.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**, 264-265 (1952).
28. Engel, L. W., Young, N. A., Tralka, T. S., Lippman, M. E., O'Brien, S. J. and Joyce, M. J.: Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res.* **38**, 3352-3364 (1978).
29. 菊地浩吉: 標識細胞障害試験. *免疫実験操作法 A*, 349-351 (1975).
30. 堀 泰祐, 菅 典道, 大垣和久, 山崎信保, 中山昇, 仁尾義則, 稲本 俊: 腫瘍浸潤リンパ球の TCGF 培養による特異的抗腫瘍能の誘導に関する基礎的研究. *日外会誌* **85**, 749-757 (1984).
31. Rosenberg, S. A. and Terry, W. D.: Passive immunotherapy of cancer in animals and man. *Adv. Cancer Res.* **25**, 323-388 (1977).
32. Morgas, D. A., Ruscetti, F. W. and Gallo, R.: Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* **193**, 1007-1008 (1976).
33. Eberlein, T. J., Rosenstein, M., Spiess, R., Wesley, R. and Rosenberg, S. A.: Adoptive chemoimmunotherapy of a syngeneic murine lymphoma with long-term lymphoid cell lines expanded in T cell growth factor. *Cancer Immunol. Immunother.* **13**, 5-13 (1982).
34. Cheever, M. A., Greenberg, P. D., Fefer, A. and Gillis, S.: 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).
35. Slankard-Chahinian, M., Holland, J. F., Gordon, R. E., Becker, J. and Ohnuma, T.: Adoptive autoimmunotherapy: Cytotoxic effect of an autologous long-term T-cell line on malignant melanoma. *Cancer* **53**, 1066-1072 (1984).
36. Yamasaki, T., Hand, H., Yamashita, J., Watanabe, Y., Namba, Y. and Hanaoka, M.: Specific adoptive immunotherapy with tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte clone for murine malignant gliomas. *Cancer Res.* **44**, 1776-1783 (1984).
37. Lafreniere, R., Rosenberg, S. A.: Successful immunotherapy of experimental hepatic metastases with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2. *Cancer Res.* **45**, 3735-3741 (1985).
38. Vose, B. M., Vanky, F. and Klein, E.: Human tumor-lymphocyte interaction *in vitro*. *V. Com-*

- parison of the reactivity of tumor-infiltrating, blood and lymph-node lymphocytes with autologous tumor cells. *Int. J. Cancer* **20**, 895-902 (1977).
39. Gillis, S., Baker, P. E., Ruscetti, F. W. and Smith, K. A.: Long-term culture of human antigen-specific cytotoxic T-cell lines. *J. Exp. Med.* **148**, 1093-1093 (1978).
  40. Vose, B. M., Gallagher, P., Moore, M. and Schofield, P. F.: Specific and non-specific lymphocyte cytotoxicity in colon carcinoma. *Br. J. Cancer* **44**, 846-855 (1981).
  41. Kimura, H., Yamaguchi, Y. and Fujisawa, T.: Cytotoxicity of autologous and allogeneic lymphocytes against cultured human lung cancer cells: Optimal conditions for the production of cytotoxic lymphocytes. *Jpn. J. Cancer Res.* **75**, 1006-1016 (1984).
  42. Uchida, A. and Micksche, M.: Lysis of fresh human tumor cells by autologous large granular lymphocytes from peripheral blood and pleural effusions. *Int. J. Cancer* **32**, 37-44 (1983).
  43. 後藤精俊: Interleukin-2による胃癌組織浸潤リンパ球の Cytotoxicity の増殖. *日外会誌* **86**, 1600-1607 (1985).
  44. Plata, F.: Specificity studies of cytotoxic T lymphocytes directed against murine leukemia virus-induced tumors. *J. Exp. Med.* **155**, 1050-1062 (1982).
  45. Kedar, E. and Weises, D. W.: The *in vitro* generation of effector lymphocytes and their employment in tumor immunotherapy. *Adv. Cancer Res.* **38**, 171-287 (1983).
  46. Kranz, D. M., Tonegawa, S. and Eisen, H. N.: Attachment of an anti-receptor antibody to non-target cells renders them susceptible to lysis by a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7922-7926 (1984).
  47. De Vries, J. E. and Spits, H.: Cloned human cytotoxic T lymphocyte (CTL) lines reactive with autologous melanoma cells. 1. *In vitro* generation, isolation, and analysis to phenotype and specificity. *J. Immunol.* **132**, 510-519 (1984).
  48. Spits, C., Ijssel, H., Terhost, C. and De Vries, J. E.: 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).
  49. Yssel, H., Spits, H. and De Vries, J. E.: A cloned human T cell line cytotoxic for autologous and allogeneic B lymphoma cells. *J. Exp. Med.* **160**, 239-254 (1984).
  50. Vose, B. M. and White, W.: Tumor-reactive lymphocytes stimulated in mixed lymphocyte and tumor culture. Clonal analysis of effector cells in cytotoxic and proliferative assays. *Cancer Immunol. Immunother.* **15**, 227-236 (1983).
  51. Mukherji, B. and MacAlister.: Clonal analysis of cytotoxic T cell response against human melanoma. *J. Exp. Med.* **158**, 240-245 (1983).
  52. Sato, T., Sato, N., Takahashi, S., Koshiha, H. and Kikuchi, K.: Demonstration of the specific cytotoxicity on the human autologous mammary cancer cells of a long-term cultured T cell clone. *Cancer Res.* **46**(1986) in press.
  53. Meuer, S. C., Hussey, R. E., Hodgdon, J. C., Hercend, T., Schlossman, S. F. and Reinherz, E. L.: Surface structures involved in target recognition by human cytotoxic T lymphocytes. *Science* **218**, 471-473 (1982).
  54. Meuer, S. C., Schlossman, S. F. and Reinherz, E. K.: Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T 4+ and T 8+ effector T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4395-4399 (1982).
  55. Rogers, M. J., Appella, E., Rierotti, M. A., Invernizzi, G. and Parmiani, G.: Biochemical characterization of alien H-2 antigens expressed on a methylcholanthrene-induced tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1415-1419 (1979).

---

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学外科学第1講座 佐藤 卓