

[原著] 同系腫瘍に対する細胞障害性 T 細胞の性状
の解析と長期培養に関する研究

林 良 輔

(昭和58年9月6日受付)

要 旨

腫瘍に対する免疫学的拒絶を担っている免疫細胞は、主として細胞障害性T細胞 (Tc) であることはすでに知られているが、腫瘍免疫の担い手である同系腫瘍に対する Tc の性状を調べるとともに、T細胞マイトゲンである Concanavalin A によりマウス脾細胞を刺激した培養の上清に含まれるT細胞増殖因子 (TCGF) を用いて、同系腫瘍に対する Tc の長期培養の実験を行った。

メチルコロントレンで誘発した A/J マウス (H-2^a; K^k, D^d) 由来の線維芽細胞肉腫 S1509a をマイトマイシンCで処理したのち、その 1×10^6 を同系マウスに i. p. で免疫し、14日後に脾細胞をとり出して、再びマイトマイシンCで処理した同一腫瘍細胞と *in vitro* で5日間培養することにより、Tc を誘導した。この Tc の性状を調べてみると、Thy-1⁺, Lyt-2⁺ であり、⁵¹Cr による標的細胞破壊試験において、この Tc の細胞障害活性をみると、S1509a を特異的に障害した。またこの Tc の細胞障害試験において、標的細胞の S1509a を抗 H-2 抗血清で処理すると、抗 H-2K^k および抗 H-2D^d で特異的にブロックしたことより、この細胞破壊作用には、H-2 抗原の関与があることが明らかであった。

TCGF を用いてこの Tc を培養すると、細胞数の増加とともに細胞障害活性も増強の傾向がみられ、活性をもった Tc のクローンが8週間維持できた。この結果、ヒトにおいて特異的な免疫療法への臨床応用の可能性が示唆された。

Keywords : 細胞障害性T細胞, 同系腫瘍, T細胞増殖因子, 細胞障害試験, H-2 抗原

略語一覧 : Con A, Concanavalin A; TC GF, T cell growth factor; Tc, cytotoxic T cell; PHA, phytohemagglutinin; FCS, fetal calf serum; MMC, mitomycin C; NMS, normal mouse serum; HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfuric acid; D'MEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; 2-ME, 2-mercaptoethanol

はじめに

T細胞は機能を異にしているいくつかのサブセットに分かれ、それらの作用機序や性状の解析が現代免疫学の一つの大きな課題となっている。そのT細胞のサブセットのうち、細胞障害性T細胞 (Tc) は、同種移植片や腫瘍に対する免疫学的拒絶を担っている免疫細胞の主たるものであることはすでによく知られている。この細胞障害性T細胞の解析のため、多くの研究者たちが細胞障

害性T細胞の長期培養の実験を試みてきたが、マウスの系において *in vitro* で異系抗原の反復刺激により異系抗原に特異的な細胞障害性T細胞が長期にわたり培養できるという報告が出てきた^{1,2,3)}。近年、Morgan らはヒトにおいて末梢リンパ球をT細胞マイトゲンである PHA で刺激して作製した増殖因子により、T細胞の長期培養に成功し^{4,5)}、また Gillis らは、マウスにおいてT細胞マイトゲンである Con A にてリンパ球を刺激した上清を用いることにより、異系腫瘍に対する細胞障害

* 千葉大学医学部第二外科学教室

Ryosuke HAYASHI: Characteristics and Long-term Culture of Cytotoxic T Cells against Syngeneic Tumor. Second Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University, Chiba 280.

Received for publication, September 6, 1983.

性T細胞の長期培養に成功している^{6,7,8)}。これらの上清はT細胞増殖因子 (TCGF) と呼ばれ、T細胞、特に細胞障害性T細胞を増殖させるものである。最近、このTCGFを用いて長期培養することにより、異系腫瘍に対する細胞障害性T細胞をクローン化しているという報告も出ている^{9,10,11,12)}。

そこで、腫瘍免疫の担い手である腫瘍に対する細胞障害性T細胞の性状を調べるとともに、TCGFを用いて同系腫瘍に対する細胞障害性T細胞の長期培養の実験を行った。

実験方法

1) 実験動物

マウスは生後6週から12週のものを用いた。細胞障害性T細胞の誘導実験にはA/Jマウス(クロダ実験動物、熊本)を用い、TCGF作製にはDBA/2マウス(静岡県実験動物)を用いた。

2) 腫瘍

メチルコラントレンを用いA/Jマウスに誘発した線維芽細胞肉腫であるS1509a, SaI, S713aと、A/Jマウスに自然発生したT細胞リンパ腫であるL1117の4種類の腫瘍細胞を標的細胞として用いた。S1509a腫瘍細胞は、*in vivo* および *in vitro* にてA/Jマウスの免疫に用いた。これらの腫瘍細胞は、5%牛胎児血清(FCS, GIBCO社製)を含んだRPMI1640培養液(GIBCO社製)により*in vitro* で培養増殖させた。

3) 同系腫瘍に対する細胞障害性T細胞の誘導

マイトマイシンC (MMC) 100 µg/ml で30分間処理したS1509a細胞 1×10^6 個を同系マウス(A/J)の腹腔内に注入し免疫した。*in vivo* で免疫後14日目に、免疫したマウスの脾細胞およびリンパ節細胞に、MMCで処理したS1509a細胞を300対1の割合で加え再刺激(*In vitro* secondary stimulation¹³⁾)させたのち、5% FCS, 20 mM HEPES, 200 µg/ml カナマイシン(KM) および 5×10^{-5} M 2ME を含んだD'MEM培養液(GIBCO社製)中に浮遊させ、37°C, 5% CO₂ 下のインキュベーターで5日間培養させた。このように*in vivo* および *in vitro* において2回刺激させたリンパ球を、細胞障害性試験におけるエフェクター細胞として用いた。同時に、正常のA/Jマウスより取り出し、同じように5日間培養させた細胞をコントロールとして用いた。

4) 細胞障害試験¹⁵⁾

5×10^6 個の標的腫瘍細胞を10% FCSを含んだHanks' 液0.5ml中で、50 µCiの⁵¹Cr (Na₂⁵¹CrO₄ :

日本エネルギー研究所)を加え、37°Cで45分間、時々振盪させながら培養し、ラベルさせた。その後、余分の⁵¹Crを除くため標識した細胞をHanks' 液で3回洗浄し、5% FCSおよび20mM HEPESを含んだD'MEM培養液に再浮遊させ、標識標的腫瘍細胞として用いた。前述した方法で活性化させた細胞障害性T細胞あるいは正常マウスリンパ球と、⁵¹Crでラベルされた標的細胞を、96穴の丸底マイクロテストプレートで混合した。プレートは200×Gで3分間遠心し、37°C条件下で16時間培養した。16時間後各ウエルより上清を0.1ml取り出し、well type scintillation counter (Dinabot Ltd., Model No. AUTO-AL201)でradio activity (cpm)を計測した。標的細胞破壊のパーセントは次の計算式で算出した。

$$\% \text{ specific release} = \frac{\text{cpm experimental} - \text{cpm control}}{\text{cpm maximal} - \text{cpm control}} \times 100$$

maximal countは、2.5%サポニン溶液で標的細胞を崩壊することにより求めた。標的細胞と正常リンパ球とのcontrol countはmaximal countの25%以内、標的細胞に培養液(5% FCSを含むD'MEM培養液)を入れただけのspontaneous countはmaximumの20%以下であるようにした。

5) TCGFの作製^{8,15)}

マウス脾細胞をT細胞マイトゲンで刺激した培養上清を用いた。DBA/2マウスより脾臓を無菌的に取り出し、Hanks' 液中でloosely fitting hand homogenizerを用いて単細胞浮遊液とした。ここで、トリス塩化アンモニウム溶液を用いて溶血させた。1ml中 1×10^6 個の脾細胞に5 µg Con Aを加え、5% FCS加D'MEM培養液(20 mM HEPES, 200 µg/ml KMを含む)に浮遊させたのち、5% CO₂下、37°Cのインキュベーターで培養させ、48時間後にその上清をとり、300×Gで10分間遠心させたのち、0.22 µm ミリポアフィルターを通して作製した。保存は-20°Cで行った。

6) 抗血清

今回の実験で用いた抗血清は次のようなマウス血清である。抗Lyt-2.2として(C3H×B6 Ly-2.1) F₁ anti-B6, 抗H-2^aとしてB6 anti-A/J, 抗H-2K^kとして(B10・S×BALB/c) F₁ anti-B10・BR, 抗H-2D^dとしてB10・A (2R) anti-B10・Aを用いた。これらの同種抗血清は千葉大学医学部免疫研究部および高知医科大学免疫学教室で作製したものをを用いた。その他、抗Thy-1.2はモノクローナル抗体を用い、マウス脾細胞で吸収させたウサギ血清(生後2週間後)を補体として用い、コントロールに正常マウス血清としてDBA/2マ

ウスの血清を用いた。

実験結果

1) S 1509 a に対する細胞障害性T細胞の誘導

先に述べたような *In vitro* secondary stimulation, すなわち *in vivo* で MMC 処理した S 1509 a 腫瘍細胞を腹腔内に注射し免疫した A/J マウスの脾臓およびリンパ節から得たリンパ球を, MMC で処理した S 1509 a を用いて, *in vitro* で再び刺激し, 5日後にその培養リンパ球を, ^{51}Cr でラベルした 標的腫瘍細胞により細胞障害活性を測定した。Table 1 に示すように, この培養リンパ球は同じ S 1509 a に対して, エフェクター細胞と標的腫瘍細胞との比が, 40対1および20対1で顕著な細胞障害活性を示した。また, この培養リンパ球を抗 Thy-1 抗体と補体, あるいは抗 Lyt-2 抗体と補体で処理したのちに細胞障害活性を測ると, 活性は失われた。これらの結果より, *in vivo* および *in vitro* で MMC 処理した S 1509 a 腫瘍細胞にてリンパ球を刺激培養することにより, 腫瘍特異的な細胞障害性T細胞が生じること, およびこのプライムされたリンパ球は, Thy-1 および Lyt-2 抗原陽性の細胞障害性T細胞であることがわかった。

Table 1. Presence of Thy-1 and Lyt-2 antigens on cytotoxic T cells against S1509a

Tc treated with	% specific ^{51}Cr release	
	1:20*	1:40*
Untreated	14.6±0.5	20.9±0.5
Anti-Thy-1.2+C**	-4.5±2.7	-10.1±2.3
Anti-Lyt-2.2+C	5.3±0.5	6.1±1.6
Rabbit C alone	15.7±3.5	20.1±0.4

*Effector to target ratio **Complement

2) S 1509 a 腫瘍細胞に対する細胞障害性T細胞の特異性

この S 1509 a 腫瘍細胞に対する細胞障害性T細胞の特異性をみるために, 標的細胞として, 同じ A/J マウス由来の腫瘍である SaI, S 713 a および L 1117を用いたときの細胞障害活性を調べた。SaI と S 713 a は S 1509 a と同じく, A/J マウスにメチルコラントレンで誘発した線維芽細胞肉腫であり, L 1117は自然発生したT細胞リンパ腫である。SaI は S 1509 a と強い交叉反応性をもつ腫瘍であることはすでにわかっており¹⁰⁾, Table 2 に示すように, S 1509 a と SaI を標的細胞とすると, これらの腫瘍細胞を同程度破壊するのに対し

Table 2. Specificity of cytotoxic T cells against S1509a

Target cells	% lysis*	Cytotoxicity
S1509a	15.5±1.3	+
SaI	11.3±1.7	+
S713a	4.5±0.6	-
L1117	2.5±0.5	-

*E/T ratio=20:1

て, 同系の腫瘍ではあるが, S 713 a あるいは L 1117を標的細胞としたときは, まったく破壊しなかった。

さらに, この S 1509 a で誘導された細胞障害性T細胞の特異性を確認するために, ^{51}Cr でラベルしてある S 1509 a と ^{51}Cr でラベルしていない腫瘍細胞 (cold target tumor) とを, 細胞障害性T細胞 source の中に入れることによって, ^{51}Cr でラベルしてある S 1509 a 細胞の破壊に特異的な破壊阻止, すなわち cold target inhibition が起こるかどうかを調べた。Table 3 に示す

Table 3. Inhibition of cytotoxic T cell activity by cold homologous tumor cells

Inhibition antigens	% lysis*	Inhibition
None	28.7±1.4	
S1509a	4.0±0.6	+
SaI	9.4±0.9	+
S713a	28.8±1.9	-
L1117	24.0±1.3	-

*Target : Tc : cold tumor cells ratio=1:20:10

ように, 先の標的細胞破壊試験で, S 1509 a と交叉反応性を示した SaI および免疫に用いた S 1509 a を cold target tumor として, ^{51}Cr で標識した target の10倍量を加えると明らかに標的細胞破壊の阻止がみられた。これに対して, S 1509 a とは交叉反応性を示さなかった S 713 a あるいは L 1117を cold target tumor としたときには, まったく標的細胞破壊の阻止がみられなかった。これらの実験結果より, S 1509 a に対する細胞障害性T細胞は, S 1509 a および S 1509 a と強い交叉反応性を示す SaI のみを特異的に破壊することが明らかとなった。

3) 標的細胞破壊における自己抗原 H-2 の関与

同系腫瘍細胞に対する細胞障害性T細胞が標的細胞破壊の際に, 腫瘍抗原だけでなく自己の抗原である H-2 の認識がなされているかどうかを調べるために, 抗 H-2 同種抗血清を用いて標的細胞である S 1509 a 腫瘍細胞

を処理することにより、細胞障害性T細胞の標的細胞破壊が阻止されるのかどうかの実験を行った。A/J マウスは、H-2抗原系の Haplotype が H-2^a で、K エンドが k, D エンドが d の recombinant mouse である。そこで抗 H-2 同種抗血清として、抗 H-2^a, 抗 H-2K^k および抗 H-2D^d 抗血清を用いた。同時に、コントロールとして normal mouse serum を用いた。Fig. 1 に示すように、抗 H-2^a で標的細胞を処理すると、血清希釈 4 倍ないし 8 倍で標的細胞破壊試験における細胞障害活性が完全に消失した。また抗 H-2K^k あるいは

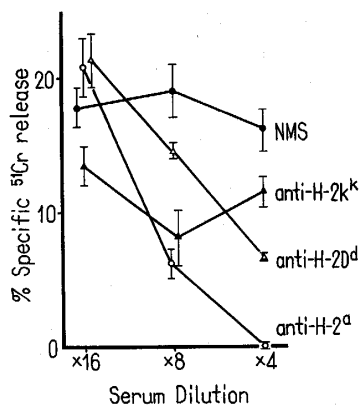


Fig. 1. Inhibition of Tc activity against S1509a with anti-H-2 alloantisera

抗 H-2D^d 抗血清で標的細胞を処理すると、血清希釈 4 倍ないし 8 倍での細胞障害活性が、抗 H-2^a の約半分程度の細胞障害活性の阻止がみられた。このことは、腫瘍上にある H-2 抗原が抗 H-2 抗血清でマスクされ、活性がおこらなくなったと考えられ、腫瘍に対する細胞障害性T細胞も標的細胞破壊の際に、抗原である腫瘍細胞上の自己の抗原としての H-2 抗原を同時に認識していることが明らかとなった。また、抗 H-2^a による細胞障害活性の阻止は血清希釈が 4 倍で完全であるのに対して、抗 H-2K^k あるいは抗 H-2D^d 抗血清による阻止が抗 H-2^a による阻止の約半分であったのは、S1509a に対する細胞障害性T細胞には少なくとも、H-2K を自己として認識するクローンと、H-2D を自己として認識するクローンが存在するためであると考えられる。

4) 同系腫瘍に対する細胞障害性T細胞の長期培養

腫瘍免疫の担い手の一つである細胞障害性T細胞の活性発現機構や抗原認識構造の分子機構の解析を目的として、S1509a に対する同系の細胞障害性T細胞の長期培養を試みた。先に述べた通り、*in vivo* で S1509a 腫瘍細胞によりプライムした A/J マウスの脾細胞を *in vitro* で再び活性化させ、5日間培養した。細胞障害活

性のあることを確めたのち、TCGF を 50% 加えて 7 日間培養すると、Table 4 で示すように、C57BL/6 マウスの脾細胞より作製した TCGF を用いた場合、オリジナルの細胞数の 9.6 倍に、DBA/2 マウスの脾細胞より作製した TCGF を用いた場合 12.0 倍に、また Con A を適当量混ぜた FCS を含む D'MEM 培養液を用いると 8.8 倍にそれぞれ細胞増加がみられたが、FCS を含んだ D'MEM 培養液のみでは 0.4 倍と減少した。同時にそれぞれの培養液で 7 日間培養した時の細胞障害活性を調べると、Table 5 に示したように、DBA/2 マウスより作製した TCGF あるいは C57BL/6 マウスより作製

Table 4. Effect of T cell growth factor on growth of activated spleen cells against S1509a (7 days after)

Added with	Cell number*
Medium** alone	2.0×10 ⁴ /ml (× 0.4)
Medium+Con A	4.4×10 ⁵ /ml (× 8.8)
C57BL/6 TCGF	4.8×10 ⁵ /ml (× 9.6)
DBA/2 TCGF	6.0×10 ⁵ /ml (× 12.0)

*Original cell number 5×10⁴/ml

**RPMI 1640 with 10% FCS

Table 5. Effect of T cell growth factor on maintenance of Tc activity (7 days after)

Added with	% lysis* (E/T ratio=20:1)
Medium alone	8.8±1.8
Medium+Con A	5.5±2.2
C57BL/6 TCGF	18.3±1.3
DBA/2 TCGF	23.3±1.1

*Original cytotoxicity 17.5±1.4

した TCGF でも細胞障害活性は維持されていた。以上、細胞数および細胞障害活性の両面より以後の実験では DBA/2 の脾細胞より作製した TCGF を用いた。

S1509a に対する細胞障害性T細胞を誘導したのち、7日毎に TCGF を加えてこのリンパ球を長期間 *in vitro* で培養し維持させた。その結果、Table 6 のように 2 ないし 4 週後でも、腫瘍細胞に対するリンパ球数の比率を初めの 1/4 にしても細胞障害活性は維持でき、最高 8 週後でも細胞の増殖とともに細胞障害活性のある細胞障害性T細胞が維持できた。この結果より、初め数少なかった活性をもった細胞障害性T細胞が増殖し、純粋なクローンではないとしても、同系腫瘍に対する細胞障害性T細胞のクローンが長期間維持できた。

Table 6. Maintenance of cytotoxic T cell line with T cell growth factor

Original cytotoxicity (E/T ratio=20:1)	+ 2 w.	+ 4 w. (E/T ratio=5:1)	+ 8 w.	+12w.
18.0±0.8*	15.1±1.3	6.9±0.9		
19.6±1.5	20.3±2.1	8.6±1.2		
28.1±0.9	11.4±0.5	15.8±1.3	5.8±1.1	
9.9±1.9	10.4±0.8	14.4±1.2	16.0±0.5	5.0±1.0

*%lysis

考 察

T細胞の機能とその細胞表面のマーカーとの関連についての研究は、現代免疫学の一つの大きな課題である。マウスのT細胞は Thy-1 抗原を有しており、その他にも Lyt 抗原がマーカーとして知られている。Lyt 抗原のうち、T細胞の機能との関連で、Lyt-1, Lyt-2.3 抗原がよく調べられており、Lyt-1 は第 19 番目、Lyt-2.3 は第 6 番目の染色体上の遺伝子によってコードされている。この Lyt-2.3 抗原は細胞表面上での存在連帯性をもち、Lyt-2 陽性細胞は Lyt-3 も陽性であり、また Lyt-3 陰性細胞は Lyt-2 も陰性であることがわかっている。最近、同種抗 Lyt-2 血清が同種標的細胞に対する細胞障害性T細胞の細胞障害活性を *in vitro* で阻止することが見出されていることから、Lyt-2 抗原と細胞障害性T細胞のレセプターとの関係が注目されている¹⁷⁾。細胞障害性T細胞の Lyt の表現型はおおかた Lyt-1⁺, 2⁺, 3⁺ であるが、同系腫瘍に対する細胞障害性T細胞に Lyt-1⁺, 2⁺, 3⁺ の細胞もあることが最近明らかになりつつある。

近年、ウイルス感染細胞に対する細胞障害性T細胞がウイルスゲノムによって表現される抗原のみを認識して破壊するのではなく、マウスの主要組織適合抗原である H-2 抗原、H-2 K 座あるいは H-2 D 座の遺伝子産物をも同時に認識して破壊することが明らかとなっている^{18,19)}。細胞障害性T細胞の抗原認識構造には、dual recognition hypothesis および altered self hypothesis の二通りの考え方があるが、どちらが正しいにしても、細胞障害性T細胞の抗原認識には自己の抗原が関与していることになる²⁰⁾。ウイルスに特異的な細胞障害性T細胞のみでなく、*in vitro* でリンパ球をハプテン化した自己のリンパ球との混合培養により誘導した細胞障害性T細胞においても、H-2 K あるいは H-2 D 領域の遺伝子産物を同時に特異的に認識していることが明らかにされた²¹⁾。今回の実験において、活性化リンパ球が抗 Thy-1 抗体および抗 Lyt-2 抗体と補体の処理によって活性を

失なったことから、同系腫瘍に対する細胞障害活性をもったこのリンパ球は、確かに同系腫瘍に対する細胞障害性T細胞であることがわかった。また、この細胞障害性T細胞に対して、homologous な腫瘍細胞を用いた細胞障害活性および cold target inhibition により、同系腫瘍に特異的な細胞障害性T細胞であることが確認できた。抗原認識機構において自己抗原が関与するという Zinkernagel らの説についても、抗 H-2 抗血清を用いた実験結果により、この同系腫瘍に対する細胞障害性T細胞においても H-2 抗原系、H-2 K および H-2 D 抗原の関与があることが確認された。

一方、細胞隔合法などにより細胞障害性T細胞の細胞株を樹立しようという研究も試みられているが成功した例は非常に少ない。リンパ球の長期継代培養は非常に困難であったが、1976年 Morgan らは、ヒト末梢血リンパ球をT細胞マイトゲンである PHA で刺激した培養上清に、T細胞を長期間分裂増殖させる因子が含まれ、TCGF と呼ばれるこの因子で長期間培養したヒト末梢血リンパ球は、T細胞の機能を残したまま *in vitro* で増殖することを報告した^{4,5)}。その後マウスにおいても、Gillis らは TCGF を用いて異系の腫瘍に対する細胞障害性T細胞を長期間 *in vitro* にて培養し増殖させることを報告した⁶⁾。さらに、この細胞株を TCGF によりクローン化し、モノクローナルな細胞障害性T細胞株が培養できること、また cloning された 80%以上のものが細胞障害性T細胞としての機能を有していることにより、TCGF は細胞障害性T細胞に最も有効に作用すると報告している¹⁴⁾。その後も、抗原特異性を維持したまま分化したT細胞を TCGF を用いて樹立しようとする研究がすすめられている。今回の実験でもある程度の期間ではあるが、リンパ球としては長期間にわたり、同系腫瘍に対する細胞障害性T細胞が TCGF を用いることによって培養され、増殖および活性が強くなっていくことが確認され、クローン化されていくことがわかった。

各研究者がそれぞれの実験系において様々な名称を因子に与えていたが、1979年スイスで開催された Second

International Lymphokine Workshop において、各因子を統一的に命名し直そうという動きがあったため、TCGF は thymocyte stimulating factor (TSF) などとともに interleukin 2 (IL-2) の中に含まれることになった。TCGF はまた、Growth medium (GM), Conditioned medium (CM), co-stimulator などとも呼ばれており、IL-2 として、TSF, killer cell helper factor (KHF) などとともに同じ種類のものとして一括され、これらの因子は IL-2 としてすべて同一のものである可能性が非常に強いといわれている。

以上のように、T細胞が *in vitro* で長期間分裂増殖させられることがわかり、今回の実験のように、腫瘍免疫の担い手である同系腫瘍に対する細胞障害性T細胞をTCGFを用いることにより、臨床応用として特異的な免疫療法が考えられる。たとえば、悪性腫瘍患者のリンパ球より、自己の腫瘍細胞に対して破壊能をもった細胞障害性T細胞を *in vitro* で増殖させ、元の患者に戻すことにより、治療効果が期待できるはずである。Millsらはマウスの系において、その効果について報告しており²²⁾、ヒトにおいても Lotze らは臨床的に試みており、マウスでは満足すべき効果が得られているが、ヒトにおける治療効果はいまのところ十分なものではない。しかし、投与方法などの工夫により近い将来、悪性腫瘍患者の治療法として脚光を浴びることと思われる。また、細胞障害性T細胞の免疫学的な解析も容易となり、腫瘍細胞をどのように攻撃し破壊させているかというメカニズムなどが解明されていくと思われる。

稿を終えるにあたり、御指導を戴きました恩師佐藤博教授に深甚の謝意を表します。また、直接御指導を戴きました高知医科大学免疫学教室藤本重義教授、ならびに御校閲を戴きました本学医学部環境疫学研究施設免疫研究部谷口 克教授、第二外科落合武徳助手に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第39回日本癌学会総会において発表した。

SUMMARY

It has been known that cytotoxic T cells (Tc) play an important role in immune-mediated tumor rejection. In this report, some characteristics of Tc in destroying syngeneic tumor cells were studied. The possibility of long-term maintenance of syngeneic Tc by T cell growth factor (TCGF) was also examined using methylcholanthrene induced fibrosarcoma S1509a of A/J mouse (H-2a, K^k, D^d) origin. TCGF was prepared from cul-

ture supernatants of lymphocytes stimulated with Concanavalin A.

A/J mice were immunized with 1×10^6 of tumor cells (S1509a) treated with Mitomycin C *i. p.*. Fourteen days after the immunization, lymphocytes were taken from the spleen of A/J mice and were restimulated *in vitro* with Mitomycin C treated S1509a for 5 days. Thus, the syngeneic Tc were induced, which were Thy-1 and Lyt-2 positive, and had a specific killing function for S1509a as revealed by ⁵¹Cr cytotoxicity assay. Anti-H-2K^k or anti-H-2D^d antiserum blocked specifically the cytotoxic activity, indicating that H-2 antigens participate in the process. When the syngeneic Tc were cultured with TCGF, their specific cytotoxic activity was maintained as long as 8 weeks. From the results, a possibility of clinical application of specific immunotherapy with Tc was discussed.

文 献

- 1) MacDonald, H. R., Sordat, B., Cerottini J.-C. and Brunner, K. T.: Generation of cytotoxic T lymphocytes *in vitro* IV. Functional activation of memory cells in the absence of DNA synthesis. *J. Exp. Med.* **142**, 622-636, 1975.
- 2) Denert, G. and De Rose, M.: Continuously proliferating T killer cells specific for H-2 target: Selection and characterization. *J. Immunol.* **116**, 1601-1606, 1976.
- 3) Tartof, D. and Fitch, F. W.: Immunologically specific cytolytic activity induced in long-term mixed leukocyte culture cells by Concanavalin A. *J. Immunol.* **118**, 35-42, 1977.
- 4) Morgan, D. A. and Ruscetti, F. W.: Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal bone marrows. *Science* **193**, 1007-1008, 1976.
- 5) Ruscetti, F. W., Morgan, D. A. and Gallo, R. C.: Functional and morphologic characterization of human T cells continuously grown *in vitro*. *J. Immunol.* **119**, 131-138, 1977.
- 6) Gillis, S. and Smith, K. A.: Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature* **268**, 154-156, 1977.
- 7) Gillis, S. and Smith, K. A.: *In vitro* generation of tumor-specific cytotoxic lymphocytes. Secondary allogeneic mixed tumor lymphocyte culture of normal murine spleen cells. *J. Exp. Med.* **146**, 468-482, 1977.
- 8) Gillis, S., Ferm, M. M., Ou W. and Smith, K. A.: T cell growth factor: Parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.* **120**, 2027-2032, 1978.

- 9) Rosenberg, S. A., Schwarz, S. and Spiess, P. J.: *In vitro* growth of murine T cells II. Growth of *in vitro* sensitized cells cytotoxic for alloantigens. J. Immunol. **121**, 1951-1955, 1978.
- 10) Glasebrook, A. L. and Fitch, F. W.: Alloreactive cloned T cell lines I. Interactions between cloned amplifier and cytolytic T cell lines. J. Exp. Med. **151**, 876-895, 1980.
- 11) Baker, P. E., Gillis, S. and Smith, K. A.: Monoclonal cytolytic T-cell lines. J. Exp. Med. **149**, 273-278, 1979.
- 12) Engers, H. D., Collaro, D., North, M., Boehmer, H. V., Haas, W., Hengartner, H. and Nabholz, M.: Characterization of cloned murine cytolytic T cell lines. J. Immunol. **125**, 1481-1486, 1980.
- 13) Yamauchi, K., Fujimoto, S. and Tada, T.: Differential activation of cytotoxic and suppressor T cells against syngeneic tumors in the mouse. J. Immunol. **123**, 1653-1658, 1979.
- 14) Fujimoto, S., Matsuzawa, T., Nakagawa, K. and Tada, T.: Cellular interaction between cytotoxic and suppressor T cells against syngeneic tumors in the mouse. Cell. Immunol. **38**, 378-387, 1978.
- 15) Rosenberg, S. A., Spiess, P. J. and Schwarz, S.: *In vitro* growth of human T cells I. Production of factors necessary for T cell growth. J. Immunol. **121**, 1946-1950, 1978.
- 16) Fujimoto, S., Yamauchi, K., Yamada, S. and Tada, T.: Selective stimulation and inactivation of cytotoxic and suppressor T cells in tumor immunity. Immunobiology and Immunotherapy of Cancer 147-157, 1979.
- 17) Shinohara, N. and Sachs, D. H.: 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.
- 18) Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C.: Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. Nature **251**, 547-548, 1974.
- 19) Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C.: H-2 compatibility requirement for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic virus. Different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures coded for in H-2K or H-2D. J. Exp. Med. **141**, 1427-1436, 1975.
- 20) Doherty, P. C., Blander, R. V. and Zinkernagel, R. M.: Specificity of virus-immune effector T cells for H-2K or H-2D compatible interactions: Implications for H-antigen diversity. Transplant. Rev. **29**, 89-124, 1976.
- 21) Shearer, G. M., Rehn, T. G. and Garbarino, C. A.: Cell-mediated lympholysis of trinitrophenyl-modified autologous lymphocytes. Effector cell specificity to modified cell surface components controlled by the H-2K and H-2D serological regions of the murine major histocompatibility complex. J. Exp. Med. **141**, 1348-1364, 1975.
- 22) Mills, G. B., Carlson, G. and Paetkau, V.: Generation of cytotoxic lymphocytes to syngeneic tumors by using co-stimulator (interleukin 2): *in vivo* activity. J. Immunol. **125**, 1904-1909, 1980.
- 23) Lotze, M. T., Line, B. R., Mathinsen, D. J. and Rosenberg, S. A.: The *in vivo* distribution of autologous human and murine lymphoid cells grown in T cell growth factor (TCGF): Implications for the adoptive immunotherapy of tumors. J. Immunol. **125**, 1487-1493, 1980.