QUANTITATIVE ANALYSIS OF ACTIVATED T LYMPHOCYTES
BY VIRUS PLAQUE ASSAY IN PATIENTS WITH HEAD AND NECK CANCER

HIROSHI TAKENAKA, M. D., AKINORI HOSHINO, M. D.,

SHIGERU MIYOSHI, M. D. HIDEKI KIDA, M. D.

HITOSHI SAITO, M. D. OSAMU MIZUKOSHI, M. D.

Department of Otorhinolaryngology Kyoto Prefectural University of Medicine

(Director: O. Mizukoshi, M. D.)

TAKASHI AMAGAI, Ph. D.

Department of Microbiology Kyoto Prefectural University of Medicine

(Director: T. Kishida, M. D.)

Most of the investigations about immune potential of peripheral blood lymphocytes in cancer patients up to now have been studied with non-specific or tumor specific qualitative mitotic responses in vitro. In order to study immunological responsiveness quantitatively, virus plaque assay devised by B. R. Bloom was applied to determine immune potentials of the patients with head and neck cancer and the normal subjects. It has been reported that by this method the number of activated lymphocytes with a mitogen or antigen could be enumerated. Using this method, the number of Concanavalin A (Con A)-activated lymphocytes in cancer patients was examined. The cancer patient consisted of non-Hodgkin malignant lymphoma (7 cases), lingual cancer (6 cases), laryngeal cancer (5 cases), and miscellaneous (6 cases).

The number of virus plaque forming cells (VPFC) activated by Con A was subtracted from that of VPFC without Con A. The subtracted number (Δ VPFC) in the cancer patients (-1538 ± 3197 , mean $\pm$ SD) was significantly smaller than that of 11 normal cases (9727 ± 9009) and 7 cases of benign diseases (12537 ± 23228). The number of Δ VPFC in the cancer group was generally small regardless to the difference of the primary region of cancer, TNM classification, clinical stage, and the pathological findings. There was no correlation between the number of VPFC and that of peripheral blood lymphocytes in the cancer patients.

The advantages of virus plaque assay for immunological investigation in cancer patients were emphasized.

A82-0674-00369

Virus Plaque Assay による頭頸部悪性腫瘍患者の 活性化 T リンパ球の定量的観察

京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室（主任：水越 治教授）

竹 中 洋，貴 田 秀 樹，三 好 茂，星 野 章 範，
斎 藤 等，水 越 治

京都府立医科大学微生物学教室（主任：岸田綱太郎教授）

雨 貝 孝

I 緒 言

近年耳鼻咽喉科領域においても悪性腫瘍患者の免疫応答能についての種々の検索がなされるようになり，末梢血リンパ球のT細胞比率の低下¹⁾²⁾³⁾，PPD，PHA 皮内反応陽性率の低下⁴⁾⁵⁾，PHA，Con A に対する Mitogen response の低下などの報告がある．一方，頭頸部悪性腫瘍は他科領域に比し次に述べるような特徴がある．

1) 腫瘍の進行状況を肉眼で観察しえる．したがって術後の観察も容易であり，再発，完治の見極めが容易である． 2) 抗癌剤，免疫賦活剤を多量に使用しなくても外科的処置のみで十分根治が期待できる症例もある．これらの特徴は担癌生体の免疫能の検討という点でも有利であると考ええる．

先に述べたごとく当科悪性腫瘍患者の末梢血リンパ球免疫応答能の解析は主として T B 細胞率の同定検査，リンパ球機能の面では皮内反応など定性的な方法でなされていた．今回，われわれは Bloom により開発された，活性化T細胞内ではウィルスが増殖しえることを利用したウィルスプラーク法（Virus Plaque Assay 以下 VPA 法と略す）を，悪性腫瘍患者の免疫応答能検査に用い，活性化T細胞の定量化を試みた．

II 実験方法

a) 対象：昭和52年以降，京都府立医科大学耳鼻咽喉科を受診した患者のうち， 1) 頭頸部悪性腫瘍と確定診断されたもの24例， 2) 副鼻腔炎を始めとする良性疾患々々7例，対照として 3) 正常成人供血者 11例を使用した．なお，悪性腫瘍群は原則として確定診断後未治療のものとし，ステロイド剤投与などはおこなっていない．以上の3群について下記に述べる方法にしたがって

実験をおこなった（症例内訳は表 1，2 参照）．

b) 方法：以下の2方法よりなる．

b-1)：末梢血リンパ球の培養

ヘパリン加末梢静脈血 20ml に同量のリン酸塩類等張液（以下 PBS(-) と略す）にてよく混和し Ficoll Hypaque sedimentation でリンパ球を分離，Eagle Minimum Essential Medium（以下 E-MEM と略す）

表 1

Classification of Malignant Tumors	
Malignant Lymphoma	7
Carcinoma of the Oral Tongue	6
Carcinoma of the Larynx	5
Carcinoma of the Sinuses	1
Carcinoma of the Alveoli	1
Carcinoma of the Thyroid Gland	1
Carcinoma of the Parotid Gland	1
Carcinoma of the Nose	1
Carcinoma of the Tonsil	1
total	24

表 2

Classification of other Diseases	
Otitis chr	3
Sinusitis chr	2
Mixed Tumor	1
relapsing Polychondritis	1
total	7

にて浮遊遠沈をくり返して洗浄，10% 牛胎児血清加 RPMI 1640 培地に浮遊させ，細胞数を $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し，この 1ml に Concanavalin A (以下 Con A と略す) $5\mu\text{g}$ (または $2.5\mu\text{g}$) を加えた Con A 添加群と対照として非添加群をつくり，プラスチックチューブにて 37°C 5% CO_2 下に 56 時間培養した。(表 3 参照)

表 3

b-2): VPA 法

Bloom の方法に準じ培養後回収したリンパ球を 1 回遠沈し，E-MEM に浮遊させ生細胞数を測定した。5% 牛胎児血清加 E-MEM にて 0.2ml に調整し Vesicular Stomatitis Virus, New Jersey 株 (以下 VSV と略す) を 20 multiplicity of infection 加え，よく混和した後， 37°C 5% CO_2 下に 2 時間ウィルスを吸着させた。ウィルス吸着後，浮遊遠沈をくり返してリンパ球を洗浄し，さらに抗 VSV 血清 (0.05ml/tube) 処理を 4°C にて 1 時間行い，遊離 virus を中和した。この後 2 回 E-MEM にて洗浄し，E-MEM に再浮遊させた生細胞数を測定した。ウィルスを吸着させたリンパ球はあらかじめ用意した L 細胞単層培養上によく拡散させた。この際リンパ球

表 4

は 2 段階希釈液に調整し，各希釈液 2 枚宛，L 細胞単層培養を用意した。これは細胞数にして $10^3 \sim 10^5$ に当る。次いで 5% 牛胎児血清，1% 寒天加 E-MEM を重層した。これを 37°C ，5% CO_2 下に 2 日間培養し中性赤で染色し，生じた Plaque 数を測定した (表 4 参照)。

Plaque 数はまきこんだリンパ球数 10^6 個あたりに換算し，培養液に Con A を加えた群に生じた Plaque 数より，非添加群に生じた Plaque 数を減じたものを ΔVPFC としこの数について比較検討した。式で示すと下記のごとくなる。

$\Delta\text{VPFC} = \text{Con A 添加群の VPFC} - \text{Con A 非添加群の VPFC}$ 。また，各実験に際し，正常成人末梢静脈血リンパ球を同様の方法で調べ対照として使用した。

III 結 果

a) 正常群，悪性腫瘍群，その他の疾患群の ΔVPFC :

正常群 11 例では平均 $9,727 \pm 9,009$ の ΔVPFC を認めた。最高は 31,873，最低は 3,333 である。しかし，悪性腫瘍群では最高 3,625 の ΔVPFC を示し，2 例を除

図 1

- 注) 1. 縦軸は対数表示
2. ΔVPFC が負を示したものは 0 以下にまとめて表示した。

いては50以下であった。平均 $-1,538 \pm 3,197$ の Δ VPFCを認めた。その他の疾患群7例では $12,537 \pm 23,228$ の平均値を示したが、これは Δ VPFCの値が $2,116 \sim 65,000$ となったため、悪性腫瘍群にみられた極端な低値を示すものではなく、ほぼ正常人に等しい結果を得た(図1参照)。

以下、喉頭癌、悪性リンパ腫、舌癌の症例別の測定値を示す。

a-1) 喉頭癌症は例表5に示すごとく、 $T_1N_0M_0$ 2例、

表 5

Virus Plaque Formation by Laryngeal Cancer Lymphocytes
with or without Con A

Donor's number	TNM	Pathology	PFC/ 10^6 lymphocytes		Δ PFC/ 10^6 lymphocytes
			absent	Con A present	
11*	$T_3N_0M_0$	s,c,c,	255	300	45
35	$T_4N_0M_0$		10833	6060	-4773
39	$T_{1b}N_0M_0$		0	0	0
65	$T_4N_0M_0$		18750	10714	-8036
66	$T_{1a}N_0M_0$		0	0	0

*: with Con A 2.5 μ g

s,c,c,: squamous cell carcinoma

$T_3N_0M_0$ 1例、 $T_4N_0M_0$ 2例であり、全例転移は認めていなかった。病理組織所見は全て扁平上皮癌であった。

a-2) 悪性リンパ腫は stage 分類で IEA 4例、II_{EA} 1例、IV 2例の計7例である。原発巣は 鼻腔 3例、扁桃 2例、耳下腺 1例、頸部リンパ節 1例である。全例 non Hodgikin malignant Lymphoma であった。なお、症例10は採血前、原発巣に 2000 rad のコバルト照射を施行していた。(表6参照)

a-3) 舌癌症例6例のうち、新鮮例は4例であり、これ

表 6

Virus Plaque Formation by Malignant Lymphoma Lymphocytes
with or without Con A

Donor's number	Origin	Stage	PFC/ 10^6 lymphocytes		Δ PFC/ 10^6 lymphocytes
			absent	Con A present	
10*	Neck	IV	181	165	-16
46	Tonsil	IEA	83	219	-136
47	Nose	IEA	1250	0	-1250
48	Nose	IV	400	417	17
64	Nose	IEA	0	0	0
103	Tonsil	IEA	2450	2450	0
110	Parotitis	II _{EA}	2660	1520	-1140

*: with Con A 2.5 μ g

らは全て転移を認めていない。症例13は舌半切術施行後の再発例である。症例89はコバルト照射後、舌半切術施行、検査時ブレオマイシン 30mg 投与中であった。病理組織は全て扁平上皮癌であった。症例67は手術時に腫瘍を全摘出した症例であるが、術中、抗癌剤、輸血を使用せず、術後一週目において VPFC を再検したところ 4,642 と正常域に回復しており、予後判定の指標としての有効性も示唆された(表7参照)。

表 7

Virus Plaque Formation by Lingual Cancer
Lymphocytes With or without Con A

Donor's number	TNM	Pathology	PFC/ 10^6 lymphocytes		Δ PFC/ 10^6 lymphocytes
			absent	Con A present	
13*	final	s,c,c,	1944	382	-1563
67	$T_1N_0M_0$		0	625	625
71	$T_3N_0M_0$		1461	666	-795
83	$T_3N_0M_0$		3000	2500	-500
89	therapy		9125	1563	-7562
110	$T_2N_0M_0$		2800	2600	-200

*: with Con A 2.5 μ g

s,c,c,: squamous cell carcinoma

以上検査値より、頭頸部悪性腫瘍患者では Δ VPFCとして認められた Con A 活性化Tリンパ球の数は著明に低値を示すことが明らかとなった。正常群では Δ VPFCとして認められる活性化Tリンパ球の値が約 10,000 を示したのに反して、悪性腫瘍群では、予後が非常に良好と考えられる甲状腺腺癌症例が 3,625 の値を示したのを例外として 10^2 台以下であった。

b) 末梢血リンパ球数と Con A 活性化Tリンパ球数の相関:

結果は図2に示すごとくであった。横軸に末梢血リンパ球数、縦軸に培養末梢血リンパ球 10^6 個あたりの Con A 活性化Tリンパ球の値 Δ VPFCを図示した。担癌個体ではリンパ球数が十分ある例でも活性化Tリンパ球数が減少。または、欠損していることが判った。その他の疾患群では、末梢血リンパ球数は殆ど正常域にあり、Con A 活性化Tリンパ球数も高値を示していることが明らかである。

c) 担癌患者の検査時の全身状態:

表8には末梢血中の白血球数、リンパ球数、赤血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン量を記した。白血球数は3例に10,000以上を認めたが Leukocytopenia Lymphocytopenia を示したものはなく、平均値は各々 6,547 $\pm$

図 2

- 注) 1. 縦軸は対数表示
2. Δ V-PFC が負の値を示すものは 0 以下にまとめた。

2,700(Mean $\pm$ SD), 1,729 $\pm$ 1,041(Mean $\pm$ SD) と正常域にあった。赤血球数など、その他の検査値も正常域にあり、また自他覚的に重症合併症は認めなかった。表 9 には悪性腫瘍患者 16 例の肝機能血清蛋白値を示した。LDH, GOT, GPT は全例正常値を示しており、血清蛋白も同様であった。以上より、全身状態は比較的正常に近く保れており、悪液質を示したものもなく、検査時、消耗性疾患による二次的な免疫能への影響は否定できると考える。

IV 考 按

われわれ臨床医が担癌患者の免疫動態を知る大きな目的は、「その観察法が患者の臨床経過、予後を反映するか」ということにある。言葉を替えれば、免疫動態を知ることで、臨床経過が推測されればこれに越すものはないのである。一般に人間の免疫能は細胞性免疫、液性免疫、補体からなっており、担癌生体の免疫能に関しては現在のところ、癌特異的、および非特異的細胞性免疫能

表 8

Blood Analysis of Doner's

Donor's number	WBC	Lymphocyte(%)	RBC	Ht	Hb
10	4300	774 (18)	443	45.3	15.4
11	8900	3471 (39)	524	52.5	17.5
13	10900	2616 (24)	361	35.6	10.9
19	4300	903 (21)	421	43.2	14.0
35	11300	2712 (24)	393	—	12.2
38	6200	806 (13)	400	39.0	12.8
39	8100	1620 (20)	485	45.5	15.3
46	6000	960 (16)	430	44.5	15.2
47	3700	555 (15)	478	47.4	15.7
48	6800	680 (10)	347	34.8	11.5
64	—	—	—	—	—
65	11200	4144 (37)	490	47.4	17.0
66	4900	2401 (49)	456	46.9	15.7
67	3600	972 (27)	492	49.2	17.2
71	8100	1863 (23)	467	44.7	16.4
83	8500	3060 (36)	437	46.8	15.4
88	4200	1302 (31)	495	42.6	14.0
89	3700	1628 (44)	367	37.6	12.1

6547 $\pm$ 2700 1729 $\pm$ 1041 440 $\pm$ 52 44 $\pm$ 5 14.6 $\pm$ 2.1

注) 全例原則として未治療時で、しかも採血は VPA の $\pm$ 3 日間とした。No. 64は未治療時の検査施行せず

表 9

Liver Function Test

Donor's number	LDH	GOT	GPT	Plasma Protein	AL	GL	A/G
10	410	46	24	6.3	54.7	45.3	1.20
11	280	23	20	7.0	53.6	46.4	1.15
13	—	5	3	6.1	60.2	39.8	1.51
19	180	10	4	6.2	60.6	39.4	1.53
35	210	56	15	5.4	56.4	43.4	1.27
39	310	16	15	—	—	—	—
46	330	28	17	6.9	48.7	51.3	0.93
47	360	17	7	7.4	57.0	43.0	1.32
48	280	11	3	6.8	57.8	42.2	1.39
65	400	30	27	8.2	—	—	—
66	310	16	12	—	—	—	—
67	460	23	17	8.1	56.5	43.5	1.30
71	440	13	6	7.7	61.0	39.0	1.56
83	450	20	7	8.3	55.7	44.3	1.26
88	370	17	6	8.3	58.9	41.1	1.43
89	—	12	18	—	—	—	—

注) 全例原則として未治療時で、採血・検査は VPA の $\pm$ 3 日間とした。

表 10 癌患者の細胞性免疫能の測定＜菊地＞

	in vivo	in vitro
非 特 異 的 (一般的)	1. 末梢リンパ球数 2. 末梢T細胞数 (E-ロゼット, 抗T) T細胞 subset 数 3. 遅延型皮膚反応 一次反応: DNCB, KLH 二次反応 PPD, Candida, Mumps, 4. 同種細胞移植拒絶	1. リンパ球幼若化反応 (PHA, Con A, PWM) 2. リンパ球混合培養 3. 同種細胞障害試験 4. マクロファージ機能検査
癌 特 異 的	1. 免疫組織学的検索* 2. 癌細胞と患者リンパ球による中和試験 3. 癌細胞抗原による皮膚反応 4. 癌細胞自家移植反応	1. マクロファージ遊走阻止試験 (MIT) 2. 白血球遊走阻止試験 (LIT) 3. 癌細胞リンパ球混合培養 (MLTC) 4. 癌細胞障害試験

*癌組織内T細胞, マクロファージ浸潤. ただし非特異的反応像を含む

の測定が広く行なわれており、その方法はおよそ、表10のごとく分類されている。in vitro の細胞性免疫能については Bloom⁹⁾ が述べているように、次の2点が必要とされる。1) Effector cell が既知のリンパ球の Subpopulation と相関しているか、2) Effector cell の数の定量、反応の強さの定量ができるか、加えて in vitro の反応性が患者の予後と相関するか。これらを加味した検査法が望まれる。

現行の免疫的検査の多くは遅延型皮膚反応、種々の Mitogen によるリンパ球幼若化の測定などである。これらの方法では、拒癌状態と特に密接に関連していることが推測される細胞性免疫の担当細胞である Tリンパ球の反応性の観察は定性的なものとなっている。

われわれが今回報告する VPA は Bloom によって delayed type hypersensitivity の effector cell を in vitro において定量的に観察するために考案された⁹⁾。Jimenez¹⁰⁾ は続いて PPD の皮内反応と PPD を用いた VPFC が相関関係にあることを報告し、PPD 皮内反応陽性群において末梢血中の antigen sensitive cell を定量化するのに成功した。本法の基礎は、元来末梢血のリンパ球内で休止期にウィルスが増殖することはないが、PHA, Con A など活性化されたリンパ球のあるものではウィルスが増殖可能であるという事実によっている。すなわち、予め Con A など Mitogen によって活性化されたリンパ球にウィルスを吸着させ、その細胞中でのウィルス増殖の結果、リンパ球の崩解とウィルスの

放出が生じることを利用して、逆に活性化 Tリンパ球数をブランクとして定量するということである。われわれは Con A を用いて Tリンパ球を活性化し、VPFC を測定した。本法は他の in vitro の細胞性免疫能検査法と違い活性化 Tリンパ球の定量化が可能であるということにその特徴がある (図3参照)。

図 3

注) VPA の模式図。下は Con A で活性化された活性化 Tリンパ球中での VSV の増殖を示す。上は非活性の Tリンパ球と VSV の関係を示す

近年 VPAを用いた研究は精力的におこなわれている。Bloom¹²⁾ がマウス脾細胞を用いて VPFC が Tリンパ球に属することを明らかにしたのち、狩野ら¹³⁾¹⁴⁾ はマウスの primary MLC で VPFC の発現が I regionの違いに反応する細胞群であることを示している。湊ら¹⁵⁾ は SRBC を用いた抗体産生系で antigen sensitive VPFC は helper T cell, effector T cell またはその前駆細胞のいずれにも属しない細胞である種の Suppressor T cell

はないかと報告した。また Senik ら¹⁸⁾ はマウスの secondary MLC にて VPFC と cytotoxic T cell の相関を認めている。(MLC は mixed lymphocyte culture の略)。一方 Inkeles¹⁷⁾ は人間の系にて細胞性免疫能の一指標として VPA を使用し、老化により VPFC が低下することを述べている。Bloom¹⁸⁾ は悪性腫瘍患者にて Con A 活性化 Tリンパ球の定量を行いその低下を認めているが、臨像の詳細については不明である。(表 11 参照)。現在までの VPA を用いた研究を表 12 に示す。

表 11

注) Bloom ら

表 12

VSV sensitive cells		
Human	PPD reactive cells	Jimenez et, al,
	Mitogen activate cells	Bloom et, al,
Mouse	GVH reactive T cells	Romano et,al,
	I ₂ reactive T cells	Kano et, al,
	Cytotoxic T lymphocytes (precursors)	Senik et, al,
	Immature T sub set	Minato et, al,
	DTH effector supressor	Minato et, al,

注) VPA を用いた研究

以上が VPA を用いた研究の概要の紹介であるが、耳鼻咽喉科領域における担癌生体の免疫能検索は緒言で述

べたごとく、その多くが癌に非特異的な細胞性免疫能検査に属しており、定性的なものである。中島ら¹⁹⁾による補体と遅延型過敏症の相関による免疫能の判定の報告もあるが、これも定量的なものではない。また、田端らによるマクロファージ遊走阻止試験²⁰⁾²¹⁾、細胞障害性検査²²⁾²³⁾の紹介もあるが、現在、結論はまだ得られていない。

われわれが報告した VPA による Con A 活性化 Tリンパ球の定量的観察では担癌生体と正常者群、その他の疾患で著明な差を認めたが、これが Con A の活性化作用の差によるものではないかという疑問が生じるが、例数が少く結論を下すことはできないが、上記三群において著明な mitotic responses の相異は認めていない。一方このことは実際に活性化された Tリンパ球と ΔVPFC との解離現象を意味するが、現在のところその意味は明らかでない。なお現在症例を増やしつつあるが術後に ΔVPFC の著明な増加を認めた例もあり今後検討を続けたい。

われわれは、以上のような結果より、担癌生体における Con A 活性化 VPFC の著明な低下は 1) ウィルス感受性 T cell subset の消失。または、2) 担癌生体リンパ球が特異的にウィルス抵抗性を獲得した。などが考えられる。しかしながら VPA に関しては今後次の点を明らかにしなければならぬと考える。1) VPFC がいかなる T cell subset に属するものかの検討とその細胞機能の解明。2) Con A などにより誘導されるであろう immune Interferon など lymphokine の影響の同定。3) 術前術後を始めとして全臨床経過をリンパ球幼若化反応、遅延型皮過敏症などの他の細胞性免疫能検査と平行して観察して比較検討すること。

結 語

頭頸部領域の担癌生体24例について VPA による Con A 活性化 Tリンパ球の定量化を試み正常群、その他の疾患群と比較して著明な低値をみた。この低値は、悪性腫瘍の発生殖器管、病理組織、TNM 分類に何ら相関が認められなかった。このことより VPA は担癌生体の免疫動態を知るうえで極めて有用であることを確認した。

参 考 文 献

- 1) 榎本雅夫 他：悪性腫瘍の免疫学的アプローチ（第一報）— 担癌患者の T, B cell の動態と PPD 皮内反応を中心として — 耳鼻腫 68: 9; 1147-1156, 1975.

- 2) 三宅浩郷 他：頭頸部悪性腫瘍患者における免疫機能の動態について（第一報）耳鼻臨 71: 6; 853-864, 1978.
 - 3) *R J Eastham*: T-cell Rosette Test in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Arch Otolaryngol* 102: 171-175, 1976.
 - 4) 松井和夫 他：悪性腫瘍の免疫学的アプローチ（第三報）— 担癌患者の PPD 皮内反応と DNCB 皮内反応について — 耳鼻臨 69: 3; 307-311, 1976.
 - 5) 朝倉光司 他：皮膚反応からみた頭頸部悪性腫瘍の免疫療法、診療と新薬 15: 12; 41-46, 1978.
 - 6) 滝元 徹 他：全血微量法によるリンパ球幼若化反応, 耳鼻臨, 71: 11; 1429-1436, 1978.
 - 7) 菊池浩吉 他：がんと免疫, 総合臨床, 26: 12; 2874-2882, 1977.
 - 8) *Bloom B R*: Evaluation of in Vitro Methods for Assaying Tumor Immunity. *Bloom B R and David J R (editors) Academic Press, Inc New York* 27-65 1976.
 - 9) *Bloom B R, Jimenez L and Marcus P I*: A Plaque Assay for enumerating antigen-sensitive cells in delayed-type hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 132: 16-28, 1970.
 - 10) *Jimenez L, Bloom B R, M R Blume and H F Oettgen*: On the Number and Nature of Antigen-Sensitive Lymphocytes in the Blood of Delayed Hypersensitive Human Donors. *J. Exp. Med.* 133: 740-751, 1971.
 - 11) *Edelman R and Wheelock E F*: Vesicular Stomatitis replications in human leucocyte cultures, enhancement by phytohemagglutinin. *Science*, 154: 1053, 1966.
 - 12) *Bloom B R*: Studies on the Interactions between Viruses and Lymphocytes; *Symposia on Quantitative Biology, Origins of Lymphocyte Diversity.* 41: 73-82, 1977.
 - 13) *Kano S and Bloom B R*: Studies of the mixed Lymphocyte Reaction by the Virus Plaque Assay. *Celular Immunology.* 20: 229-240, 1975.
 - 14) *Kano S and Bloom B R*: Blocking of MLC Stimulation by anti-Ia Sera, Stimulating Studies with the Virus Plaque Assay. *J. Immunology.* 117: 242-245, 1976.
 - 15) *Minato N and Katsura Y*: Virus-Replicating T cells in the Immune Response of Mice. 1, Virus Plaque Assay of the Lymphocytes Reaction to sheep Erythrocytes, *J. Exp. Med.* 390-404, 1977.
 - 16) *Senic A and Bloom B R*: Differentiation of Memory T cells Virus Plaque-Forming Cells and Cytotoxic T Lymphocytes, *J. Exp. Med.* 146: 11-20, 1977.
 - 17) *Inckeless B, etc.*: Immunological Studies of Aging. *J. Exp. Med.* 145: 1176-1186, 1977.
 - 18) *Sutcliffe S A Kadish, Storen A G and Bloom B R*: Application of the Virus Plaque Assay to the Study of Human Lymphocytes. In *Vitro Methods in cell Mediation and Tumor Immunity*, *Bloom B R and David J R (editors), Academic Press New York.* 319-341, 1976.
 - 19) 中島康夫 他：頭頸部悪性腫瘍における免疫学的検討 — 「ツ反応と補体による6期分類」を中心として. 耳鼻臨 69: 8; 963-971, 1976.
 - 20) 北庄司信裕 他：悪性腫瘍の免疫学的アプローチ（第2報）— Macrophage Migration Inhibition Test の応用, 耳鼻臨 68: 12; 1471-1475, 1975.
 - 21) 北庄司信裕 他：悪性腫瘍の免疫学的アプローチ（第5報）— MIT の臨床的意義に関する知見: 耳鼻臨 69: 8; 997-1000, 1976.
 - 22) 田端敏秀 他：悪性腫瘍の免疫学的アプローチ（第7報）培養細胞を Target とした 担癌患者リンパ球の Microcytotoxicity Assay について 耳鼻臨 70: 4; 283-290, 1977.
 - 23) 田端敏秀 他：悪性腫瘍の免疫学的アプローチ（第8報）— $^{51}\text{CrNa}_2\text{O}_4$ を用いた 正常人末梢血リンパ球の Cytotoxicity Assay 耳鼻臨 71: 11; 1297-1402, 1978.
- 稿を終るにあたり、御指導を賜わった京大胸部結核研究所桂義元教授、湊長博先生に感謝いたします。また常にあたたく御教示賜わった本学微生物学岸田綱太郎教授に心よりお礼申し上げます。なお、本稿の要旨は第34回癌治療学会、第14回癌学会、第79回日耳鼻総会にて口述した。
- （原稿受付 昭和54. 3. 22日）
- 別刷請求先 〒602 京都市上京区河原町通広小路上る
梶井町 465
京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室 竹中 洋