ヒト腎腺癌由来細胞株 (KU-2) に対する 正常ヒトリンパ球の細胞障害能

T および B 細胞の免疫担当細胞としての役割について

慶応義塾大学医学部泌尿器科学教室 実 川 正 道
(主任: 田崎 寛教授)

NORMAL HUMAN LYMPHOCYTE MEDIATED CYTOTOXICITY AGAINST AN ESTABLISHED CELL LINE (KU-2) DERIVED FROM HUMAN RENAL CELL CARCINOMA: ROLE OF T & B CELLS AS EFFECTOR

Seido Jistukawa

Department of Urology, School of Medicine, Keio University, Tokyo

(Director: Prof. H. Tazaki)

In order to solve the problems related to the resistance of human being against hypernephroma, in vitro cytotoxicity of the peripheral blood lymphocytes (PBL) from healthy persons was examined using an established cell line (KU-2), which was derived from human renal cell carcinoma, as the target cells.

The original of the KU-2 was a metastatic hypernephroma in the lung, which was capable of producing erythropoietin, and the KU-2 has been established in our Department as a monolayer cell-line from the tumor successively transplanted in nude mice.

As the effector cells in the cytotoxicity assay, PBL were isolated by Ficoll-Conary method from the blood drawn from 3 healthy male and one healthy female adults. T cells and B cells separated from the PBL after removing macrophages by the carbonyl iron-powder treatment were also used as the effector cells. T cells were obtained as sheep erythrocyte-rosette (ER) forming cells, and B cells as non-ER forming cells. PBL, T cells, and B cells thus obtained were used as the effector cells either as such or after stimulation with phytohemagglutinin (PHA). In vitro cytotoxicity of the effector cells was assayed by % cytotoxicity in the microcytotoxicity assay and also by morphological observation of time lapse cinematographs. Identification of the effector cells responsible for the spontaneous lymphocyte-mediated cytotoxicity (SLMC) was made by scanning electron microscopic observation and by

* abbreviations used in this paper

CMC cell-mediated cytotoxicity

CMI cell-mediated immunity

ERF E-rosette formation

FCS fetal calf serum

GVB geratin veronal buffer

PBL peripheral blood lymphocyte

PBS phosphate buffer solution

SLMC spontaneous lymphocyte mediated cytotoxicity

SRBC sheep red blood cell

TSA tumor-specific antigen

TSTA tumor-specific transplantation antigen

immunofluorescence technique for detection of surface Ig and Fc receptors on the cells.

Cytotoxicity against KU-2 of PBL, T and B cells as such and after stimulation with PHA showed (1) the highest cytotoxicity by PHA stimulated PBL and PHA stimulated T cells (PHA induced cytotoxicity), (2) high cytotoxicity by individually isolated non PHA-stimulated B cells (SLMC), absence of cytotoxicity by individually isolated non PHA-stimulated T cells, and (3) discrepancy between the cytotoxic effects demonstrated under time lapse cinematography and % cytotoxicity determined by microcytotoxicity assay with regard to cytotoxicity by individually isolated PHA stimulated B cells. Furthermore, (4) presence of long microvilli on the surface of B cells connected closely with KU-2 cells as target cells was demonstrated under scanning electronmicroscopic observation, and (5) presence of surface Ig and Fc receptor as surface markers on B cells playing major role in SLMC was observed by immunofluorescence technique.

Above mentioned findings indicated strong possibility that cytotoxicity generated by both PHA stimulated T cells and non PHA-stimulated B cells were responsible for high cytotoxicity generated by PHA-stimulated PBL.

緒 言

腎腺癌の生物学的特徴として腫瘍と宿主間に免疫学的関係の存在を示唆する報告が多い。すなわち、腎腺癌の転移巣が根治的手術後長期間の経過の後に出現したり、転移性肺病変が腎切除後消失したりする報告がある¹⁾。腎腺癌についての今日までの腫瘍免疫学的研究は、一方において腫瘍特異性移植抗原 (tumor specific transplantation antigen 以下 TSTA) の存在については肯定的であるが個々の特異性については未解明の点が多い。

著者は免疫担当細胞 (以下 effector cell) および免疫反応機序を中心として、悪性腫瘍とくに腎腺癌における cell mediated cytotoxicity (以下 CMC) に関する問題の解明のために、まず末梢血リンパ球 (以下 PBL), および T 細胞画分, B 細胞画分を単離後、各画分細胞のヒト腎腺癌由来腫瘍細胞株に対する CMC を microcytotoxicity assay で検討すると同時に、微速度映画撮影での形態学的観察、走査型電子顕微鏡および蛍光顕微鏡による観察を行つたところ興味ある結果を得たので報告する。

材料ならびに実験方法

I 標的細胞

ヒト腎腺癌由来腫瘍細胞株 KU-2 を標的細胞とした。KU-2 は慶応義塾大学医学部泌尿器科学教室において erythropoietin 産生能のある腎腺癌の肺への転移巣をスードマウスに異種移植に成功後、それから単層の cell culture として確立されたものである²⁾³⁾。KU-2 は昭和50年9月に株化成功後、平均週に1度継代され、53年4月現在125代目に達している。

II リンパ球

正常健康者4名 (男性3名, 年齢28歳~45歳および女性1名) を血液の供給者とした。ヘパリン加プラスチック注射器で約20ml 採血後、末梢血から付着性細胞および食細胞を除去するために carbonyl iron powder 処理 (血液10ml に対し carbonyl iron powder 300 μ g の割合) をした。この様に処理した末梢血から Ficoll-Conray 比重遠心法によつて PBL を分離した⁴⁾。分離リンパ球を Hanks 液で2回, Eagle MEM で1回洗浄後, Eagle MEM 1ml に浮遊させてリンパ球を数えトリパンブルーによる dye exclusion test で viability を計算してから濃度調整をし生細胞数を 1×10^6 /ml リンパ球浮遊液とした。PBL からリンパ球の各 population の単離のためには E-rosette formation (以下 ERF) 法を用いた。最初にヒツジ赤血球 (以下 SRBC) を geratin veronal buffer (以下 GVB) で洗浄後, SRBC の数を 1×10^9 /ml に調整し, GVB に浮遊させた。ERF の陽性率を促進するために0.1ml (50単位) の neuraminidase を SRBC 浮遊液 1ml に加え, 37°Cで30分間室温に放置後 GVB で3回洗浄を行つたあと, SRBC 数を 2×10^8 /ml の濃度になるように牛胎児血清 (以下 FCS) に浮遊させた。前述の PBL に SRBC (5×10^6 /ml : 2×10^8 /ml の割合) を加え37°Cで10分間静置した。300g, 5分間の遠心後室温で60分静置後 pipetting により均一な浮遊液をつくりこれを Ficoll-Conray に重層後400g, 30分間さらに遠心した。管底部と中間層を別個に採取し, 前者を ERF 細胞, 後者を非 ERF 細胞とし, 考按で述べる理由により前者を T 細胞, 後者を B 細胞であるという理解のもとに実験を進めた。リン酸緩衝液 (pH 7.4, 以下 PBS) で洗浄後, 滲透圧ショックで溶血後さらに2回洗浄をくり

返した。

III Cytotoxicity test

Takasugi & Klein の microcytotoxicity 法を用いた⁵⁾。容量20 μ l, 60個の well からなるマイクロテスト用 tissue culture plate の各 well に標的細胞である KU-2 細胞500個/10 μ l を seed し, 3時間後に標的細胞の50倍の濃度に相当する25,000個/10 μ l からなるそれぞれの被検リンパ球を重層し, 37°C, 5% CO₂, 95% air 下で48時間培養を行った。培養終了時に生理食塩水で洗浄後, plate を振とうし viability を失った KU-2 細胞をリンパ球とともに除去し, メタノールで15分間固定, 5分間 Giemsa 染色を施した後, 倒立位相差顕微鏡で付着している細胞 (adherent cells) を算定した。コントロールとしてのリンパ球を重層しない well に付着した細胞数を算定し, 次式により % cytotoxicity を検定した。

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: リンパ球を重層しない場合に付着した KU-2 細胞数

B: リンパ球を重層した場合に付着した KU-2 細胞数

被検 effector cell として PBL, T細胞およびB細胞について microcytotoxicity test を行った。さらに上記各被検 effector cell を, 細胞数 1×10^6 /ml につき PHA 1 μ l を加えて72時間培養後の各々についても microcytotoxicity test を行った。なお各同一検体につき6個の well を用いその平均値をもつて検討した。

IV 微速度映画撮影によるリンパ球の標的細胞に対する CMC の形態学的観察

II で述べた構成の異なるリンパ球 (PBL, T細胞, B細胞) を各2群に分け, 一方は予め mitogen として PHA を添加し, 他方は無処置群とし, これらの effector cell 浮遊液を標的細胞の KU-2 に加え, 48時間混合培養を継続し, この48時間の被検リンパ球と標的細胞の反応の経時的推移を微速度映画撮影により観察した。すなわち各被検リンパ球 (PBL, T細胞, B細胞) 浮遊液を生細胞数 1×10^6 /ml に調整し, PHA 添加群には細胞浮遊液 1ml につき PHA 1 μ l を加え, 72時間37°C, 5% CO₂, 95% air 下で静置培養した。培養終了後生理食塩水にて充分洗浄してから viability を測定して細胞数を再調整 (2.5×10^6 /ml) した。一方標的細胞は予め 5×10^4 /ml に調整し, 培養用フラスコ (Falcon #3012) で24時間培養しておいた。したがって混合培養における被

検リンパ球対標的細胞の比は50:1とした。微速度映画撮影は, ① KU-2 のみ, ② KU-2 と PHA 非刺激 PBL, ③ KU-2 と PHA 刺激 PBL, ④ KU-2 と PHA 非刺激単離T細胞, ⑤ KU-2 と PHA 刺激単離T細胞, ⑥ KU-2 と PHA 非刺激単離B細胞, ⑦ KU-2 と PHA 刺激単離B細胞の7群に分け, Borex 16 mm 撮影機 (ニコン顕微鏡微速度撮影装置) により60秒間隔で48時間行つた。画像の分析に関しては微速度映画撮影開始時, 開始24時間および48時間後において, 連続する20画面の各々について KU-2 細胞の数および空胞形成, 細胞膜崩壊, 原形質流出について検討した。KU-2 の細胞については, 20画面にみられる KU-2 の細胞数を数え平均値を求め, 微速度映画撮影開始時の細胞数を1として開始24時間および48時間後における比をとつて検討した。空胞形成, 細胞膜崩壊, 原形質流出についてはその有無を調べた。

V 細胞表面構造の形態学的観察

リンパ球の標的細胞に対する細胞障害過程における両者の質的および量的相互関係を形態学的に分析するため標的細胞である KU-2 細胞に前述のごとき方法で単離したTおよびB細胞を各々重層し, 48時間混合培養したものを光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡下に観察した。すなわち KU-2 細胞をラプテック TC チェンバースライド (マイルズ・三共 #4801) 中で24時間 preincubation 後, 先に述べた方法で単離したT細胞およびB細胞 (リンパ球対標的細胞は50:1の割合) を各々重層し, 48時間後に倒立位相差光学顕微鏡 (ニコン研究用万能倒立顕微鏡 MD) で染色, 固定をせずに観察した。走査型電子顕微鏡の観察のためにはラプテック TC チェンバースライド (マイルズ・三共 #4801) の底面に予め10mm 角のカバーガラスを数個並べておき, 10% FCS 加 MEM 培養液を使用し, KU-2 細胞を37°C, 5% CO₂, 95% air 下で24時間培養後, 先に述べた方法で単離したT細胞およびB細胞を重層し (リンパ球対標的細胞は50:1の割合), さらに48時間培養後, 走査型電顕用試料に供した。すなわち細胞の付着しているカバーガラスの細片を取り PBS で KU-2 細胞に付着するリンパ球が遊離しないように静かに充分洗浄し, 2.5% glutaraldehyde (0.05M), PBS (pH 7.4) で30分間固定した。PBS で10分間洗滌後, 上昇エタノール系列で脱水後, 酢酸イソamil置換, 臨界点乾燥を行い, カーボン金蒸着を施し, Joel-JSM 35型走査型電子顕微鏡下で観察した。

VI FITC 標識抗血清を用いた effector cell の同定

KU-2 細胞を前述の方法でラプテック TC チェンバー スライドに継代培養した。24時間後に単離したリンパ球を KU-2 細胞に重層し、24時間培養後蛍光顕微鏡用試料に供した。すなわち蛍光抗体直接法を用い PBS (pH 7.2) で洗浄後乾燥固定し湿潤室内で10倍希釈 FITC 標識抗ヒト γ -globulin ヤギ血清 (ヘキスト) および FITC 標識 heat aggregated human IgG (日本抗体研究所) を各々前述のリンパ球加 KU-2 細胞混合培養に重層し、50分間湿潤室で反応させた。その後さらに PBS で3回洗浄し蛍光顕微鏡 (Standard RA Carl Zeiss) で観察した。

結 果

I 単離リンパ球の microcytotoxicity assay

PBL, 単離T細胞および単離B細胞, さらに各々を PHA で刺激した場合の KU-2 細胞に対する細胞障害能を比較した結果は (表1) のごとくである。すなわち PHA 非刺激 PBL においてみられた細胞障害能は39.3

Table 1 Cytotoxicity of different effector cells against KU-2

	% cytotoxicity at effector/ target cell ratio of 50:1 (Mean±S.D.)
PBL	39.3 ± 1.84
PBL + PHA	99.7 ± 0.65
T	28.0 ± 11.3
T + PHA	96.6 ± 3.5
B	51.9 ± 13.15
B + PHA	88.1 ± 0.92

Table 2 Changes of number of KU-2 cells after mixed culture with different effector cells

		No. of intact cells (Mean±S.D.)	No. of dividing cells (Mean)
KU-2 (control)	0	24.8 ± 4.9 (1)	2.0
	24 hrs	27.3 ± 4.6 (1.1)	2.0
	48 hrs	71.2 ± 12.9 (2.9)	1.4
KU-2 + PBL	0	12.5 ± 1.7 (1)	2.9
	24 hrs	11.7 ± 2.2 (0.9)	2.5
	48 hrs	13.3 ± 6.2 (1.1)	1.1
KU-2 + PBL + PHA	0	12.5 ± 0.7 (1)	0
	24 hrs	2.5 ± 1.4 (0.2)	0
	48 hrs	0 (0)	0
KU-2 + T	0	36.5 ± 9.4 (1)	0
	24 hrs	58.8 ± 2.9 (1.6)	0
	48 hrs	62.7 ± 6.5 (1.7)	1.3
KU-2 + T + PHA	0	10.7 ± 1.9 (1)	0
	24 hrs	1.3 ± 0.3 (0.1)	0
	48 hrs	0 (0)	0
KU-2 + B	0	18.5 ± 1.5 (1)	1.4
	24 hrs	18.4 ± 3.5 (1.0)	3.7
	48 hrs	13.9 ± 3.5 (0.8)	4.3
KU-2 + B + PHA	0	36.7 ± 2.6 (1)	2.0
	24 hrs	58.3 ± 2.9 (1.6)	0.4
	48 hrs	43.4 ± 2.6 (1.2)	3.9

±18.4 であつたが, PHA 非刺激単離B細胞のそれは 51.9±13.5とより高値である反面, PHA 非刺激単離T

Table 3 Morphological changes of KU-2 cells by different effector cells

	Number of KU-2 intact cells			Vacuole formation			Loss of distinctness of cellular membrane			Outflow of cytoplasmic substance			Cytotoxic effects	% cytotoxicity
	0	24hrs	48hrs	0	24hrs	48hrs	0	24hrs	48hrs	0	24hrs	48hrs		
KU-2 (control)	1	1.1	2.9	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
KU-2 + PBL	1	0.9	1.1	—	+	+	—	—	+	—	—	+	+	39.3
KU-2 + PBL + PHA	1	0.2	0	—	+	+	—	+	+	—	+	+	##	99.7
KU-2 + T	1	1.6	1.7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	28.0
KU-2 + T + PHA	1	0.1	0	—	+	+	—	+	+	—	+	+	##	96.6
KU-2 + B	1	1.0	0.8	—	+	+	—	+	+	—	+	+	+	51.9
KU-2 + B + PHA	1	1.6	1.2	—	+	+	—	—	+	—	—	—	+	88.1

細胞のそれは 28.0 ± 11.3 とより低いことが観察された。PHA 刺激によつては、PBL、単離T細胞、単離B細胞いずれにおいても細胞障害能が賦活化されたが、とくにPBLおよび単離T細胞においては各々 99.7 ± 0.65 , 96.6 ± 3.5 と高値を示した。なおERF法におけるTおよびB細胞の回収率は平均 98.5% と高率であつた。

II 微速度映画撮影による経時的形態学的観察(表2, 3)

① コントロールとしてのKU-2細胞の増殖過程は腫瘍細胞にみられる旺盛な増殖能に特徴づけられ、培養開始時においては形態学的に正常構造を保つているKU-2細胞数(number of intact cell 以下IC)は一画面あたり 24.8 ± 4.9 コ、分裂期にあるKU-2細胞数(number of dividing cell 以下DC)は2.0コであるが、継代培養後24時間頃から敷石状配列を示し始め、部分的にpile-upし、コロニーの周辺部では盛んに偽足を出し、アメーバ様運動が観察された。細胞の形態は一般的には紡錘型を呈し、細胞質には多量のdense granulesを含み、48時間後には画面全体に拡大するのみならず到る所で細胞がpile-upしてゆくのが観察された(IC: 71.2 ± 12.9 コ, DC: 1.4コ)。すなわち48時間の観察においてKU-2細胞は2.9倍に増殖しており個々のKU-2細胞の形態学的変化は全くみられなかつた(Fig. 1)。

② PHA非刺激PBLではKU-2細胞数は48時間後においても培養開始時の数をほぼ維持しているが(1.1倍)培養開始24時間後から細胞内空胞形成、そして48時間後には細胞膜崩壊像、原形質流出が観察され軽度の細胞障害能が認められた(Fig. 2)。

③ PHA刺激PBLではKU-2細胞数は24時間後にすでに培養開始時の1/5に減少し、48時間後には全く消失した。細胞内空胞形成、細胞膜崩壊像、原形質流出すべて24時間後にすでに観察されており高度の細胞障害能が認められた(Fig. 3)。

④ PHA非刺激単離T細胞では、KU-2細胞数は培養開始時を1.0とすると1.7でコントロールの2.9と比較すると抑制されているものの細胞の形態学的変化からは細胞障害能は殆んど認められなかつた(Fig. 4)。

⑤ PHA刺激単離T細胞では③とはほぼ同様の所見が観察された。すなわちKU-2細胞数は24時間後には1/10に減少し、48時間後には消失していた。細胞内空胞形成、細胞膜崩壊像、原形質流出などの形態学的変化も24時間後にすでに著明であり高度の細胞障害能が認められた(Fig. 5)。

⑥ PHA非刺激単離B細胞では③および⑤で観察されたような高度の細胞障害能は認められなかつたが、48時間後のKU-2細胞数は培養開始時を1.0とすると0.8で減少しており、②におけるよりも強いKU-2細胞増殖抑制が観察されると同時に、細胞内空胞形成、細胞膜崩壊像、原形質流出もより早期に起つており比較的高度の細胞障害能が認められた(Fig. 6)。

⑦ PHA刺激単離B細胞では培養48時間後のKU-2細胞数は培養開始時の1.0に対し1.2と明らかな増殖抑制効果がみられ、さらに原形質流出は殆んどみられないが細胞内空胞形成は24時間後にすでに観察され、48時間後には細胞膜が崩壊するような所見も認められ中等度の細胞障害能が観察された。しかし⑥と比較すれば軽度であつた(Fig. 7)。

以上を総括して前述の% cytotoxicityと比較検討するとPHA非刺激PBL、単離TおよびB細胞においては、いずれも微速度映画撮影下で観察されたcytotoxic effectとmicrocytotoxicity assayによる% cytotoxicityに相関がみられ、またPHA刺激PBLおよびPHA刺激単離T細胞においても同様の相関がみられたが、PHA刺激単離B細胞には相関がみられなかつた。すなわちPHA刺激単離B細胞の% cytotoxicityはPHA刺激PBLおよびPHA刺激単離T細胞のそれにつぐ高値(88.1%)を示したにもかかわらず微速度映画撮影下での観察ではPHA非刺激単離B細胞のcytotoxic effectよりも低かつた。

III 光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡の所見

光学顕微鏡的にはT細胞画分からのリンパ球はKU-2細胞の周囲に不規則に散在するのに対し、B細胞画分からのリンパ球はKU-2細胞の周辺に多数が密集する傾向があることが観察された。KU-2細胞の形態学的性状については微速度映画撮影による所見と同様で、単離T細胞における細胞障害能の欠如と、単離B細胞における比較的高度の細胞障害能が認められた(Fig. 8, 9)。

走査型電子顕微鏡による観察ではT細胞画分からのリンパ球は表面が平滑で疎な短いmicrovilliを有し、KU-2細胞の表面と緩い結合を有して散在しているが、KU-2細胞自体は特筆すべき変化を受けていなかった。一方B細胞画分からのリンパ球はその表面に長めのmicrovilliを密に有しKU-2細胞に対し多数、かつ極めて密接した結合をし、KU-2細胞自体にも細胞表面の形態学的変化がみられた(Fig. 10, 11)。

IV FITC標識血清によるeffector cellの同定FITC

標識抗ヒト γ -globulin ヤギ血清をB細胞加 KU-2 細胞混合培養に加え反応させると、KU-2 細胞と識別し得る細胞表面に必ず1〜3個あるいは多数のリンパ球が付着しているが、これらのリンパ球は蛍光を発していた (Fig. 12). また FITC 標識 heat aggregated human IgG をB細胞加 KU-2 細胞混合培養に加え反応させると KU-2 細胞表面に多数集合するリンパ球が蛍光を発しているのが観察された (Fig. 13). すなわち effector cell であるリンパ球は表面免疫グロブリン (surface immunoglobulin 以下 surface-Ig), Fc receptor 陽性であることが確認された. 一方T細胞加 KU-2 細胞混合培養においては、effector cell は FITC 標識抗ヒト γ -globulin あるいは FITC 標識 heat aggregated human IgG と反応して蛍光を発することはなかった.

考 按

実験動物における tumor-specific antigen (以下 TSA) 存在は1953年の Foley ら⁶⁾の報告が最初である. すなわちマウスの methylcholanthrene induced sarcoma を剔出後再び移植するとそのマウスは移植された sarcoma に拒絶反応を示すことが観察された. その後ポリオーマウィルスで誘導した腫瘍を使つて同様の拒絶反応が報告⁷⁾された. 各々全く成因を異にする腫瘍が宿主において同様の拒絶反応を示すことが観察されたわけで、各々の腫瘍細胞の immunity が実証され、かつ TSA の実証は感作動物における移植腫瘍生着の拒絶反応として観察されたことにより、その後一般に TSA は TSTA と呼ばれるようになり、様々な実験動物の TSTA の実証のために実験腫瘍学の領域において広汎な実験が試みられた. 一方ヒトの腫瘍における TSTA を動物実験における方法論に基き実証することは道義的に不可能であり colony inhibition assay⁸⁾, microcytotoxicity assay⁹⁾, Cr release assay⁹⁾ による抗腫瘍免疫能の in vitro assay が用いられるようになった. 臨床免疫学におけるこの in vitro technique に基く種々の腫瘍患者の免疫能に関する報告は数多く、それらによると極く最近まで腫瘍患者にみられる感作された effector cell の細胞障害能は各々の TSTA に特異的であると一般に理解されていたが¹⁰⁾¹¹⁾, Takasugi¹²⁾ (1973) らにより正常ヒトリンパ球にも同様の細胞障害能があることが明らかにされた. Pross ら¹³⁾ もやはり正常ヒトリンパ球にみられる細胞障害能を認め、その現象を spontaneous lymphocyte mediated cytotoxicity (SLMC) と命名した. 一方実験腫瘍の領域においても同様の現象が観察され natural cytotoxic

reactivity として Heberman ら¹⁴⁾により報告された. さらに1974年にいたり Takasugi¹⁵⁾ らは培養腫瘍細胞に対する CMC の特異性は腫瘍の病理組織型とは無関係であるという報告をしており、いわゆる腫瘍免疫の特異性に関する考え方は次第に変化しつつある現状である. 一方腫瘍は免疫監視機構 (immune surveillance) の障害の結果であることを示唆する臨床的経験も多く、免疫機序の解明は重要と考えられる.

著者はまず正常ヒトリンパ球を effector cell とした場合のヒト腎腺癌由来培養株に対する CMC を microcytotoxicity assay による検定から分析し、かつ微速度映画撮影により動的形態学的見地から観察し、さらに走査型電子顕微鏡および蛍光顕微鏡による所見より effector cell を同定することは意義あるものと考えた.

I 標的細胞について

In vitro における CMC の検定のための標的細胞として short term culture および established cell line が用いられており、そのいずれを標的細胞として用いるかにより CMC の効果にも差異がみられることが de Vries ら¹⁶⁾により報告されている. cell line としては HeLa 細胞¹⁷⁾, T-24 細胞¹⁸⁾¹⁹⁾, MGH-UI 細胞¹⁹⁾などが各研究者により用いられてきた.

著者が標的細胞として用いた KU-2 細胞は、ヒト腎腺癌由来腫瘍細胞株であり、生物学的特性として原発巣および転移巣の腎腺癌、さらにそのヌードマウスへの異種移植癌に認められた erythropoietin 産生能が維持されている可能性は考えられているがその免疫学的特徴についてはまだ充分解明はされていない. この KU-2 細胞が正常ヒトリンパ球の CMC の検定のために標的細胞として用いられたのはこれが最初である. KU-2 細胞増殖能についてはその doubling time が27〜28時間で他の腫瘍細胞株のそれと類似して非常に安定した増殖パターンを持っていることは、実験手技の立場から大きな利点である. KU-2 細胞がヌードマウスへの異種移植後細胞株として確立されたことは興味ある事実であると同時に、ヌードマウスへの移植継代中に erythropoietin 産生能が維持されていたことから、株化した KU-2 細胞にも原腫瘍の持つ他の生物学的特性が維持されている可能性がある. 反面その過程において腫瘍自体が宿主であるヌードマウスにより何らかの生物学的変化を受けうることも充分考えられる. 1969年に Rygaard²⁰⁾ らによりヌードマウスへのヒト悪性腫瘍の異種移植に関する最初の報告がなされた以後、多くの研究者により種々の悪性腫

Fig. 1. Time lapse cinematographic demonstration of KU-2 cells as control. Rapid proliferation of KU-2 cells, characterized by formation of cell sheet in early stage, extended to occupy entire field of vision in late stage. Marginally located KU-2 cells formed pseudopods, and KU-2 cells contained large amount of dense granules.

1—①

0

1—②

24hrs

1—③

48hrs

Fig. 2. Time lapse cinematographic demonstration of KU-2 cells with PBL. Seemingly increased number of KU-2 cells was accompanied by formation of intracellular vacuoles and degenerative changes of cellular membrane, indicating cytotoxic effect of some degree.

2—①

0

2—②

24hrs

2—③

48hrs

Fig. 3. Time lapse cinematographic demonstration of KU-2 cells with PHA [stimulated PBL. Number of KU-2 cells was markedly decreased, and furthermore integrity of viable cell structure of KU-2 cells was lost, characterized by outflow of cytoplasmic substance as well as formation of intracellular vacuoles and degenerative changes of cellular membrane, indicating cytotoxic effect of high degree.

Fig. 4. Time lapse cinematographic demonstration of KU-2 cells with T cells. Proliferation of KU-2 cells was basically identical to that of control, indicating no cytotoxic effect.

Fig. 5. Time lapse cinematographic demonstration of KU-2 cells with PHA stimulated T cells. Number of KU-2 cells was markedly decreased and destruction of integrity of viable cell structures of KU-2 cells in early stage as seen in Fig. 3, indicating cytotoxic effect of high degree.

5—①

0

5—②

24hrs

5—③

48hrs

Eig. 6. Time lapse cinematographic demonstration of KU-2 cells with B cells. Number of KU-2 cells was decreased and integrity of viable cell structure of KU-2 cells was also lost considerably, indicating cytotoxic effect of fairly high degree but less than that seen in Fig. 3.

6—①

0

6—②

24hrs

6—③

48hrs

Fig. 7. Time lapse cinematographic demonstration of KU-2 cells with PHA stimulated B cells. Seemingly increased number of KU-2 cells was accompanied by formation of intracellular vacuoles and degenerative changes of cellular membrane, indicating cytotoxic effect of some degree but less than that seen in Fig. 6.

7—①

0

7—②

24hrs

7—③

48hrs

Fig. 8. Light microscopic demonstration of KU-2 cells with T cells. T cells were scattered away from intact KU-2 cells.

Fig. 9. Light microscopic demonstration of KU-2 cells with B cells. B cells were located adjacent to KU-2 cells which were being destroyed.

Fig. 10. Scanning electron microscopic demonstration of KU-2 cell and T cells. Lymphocytes from ERF cell rich fraction were loosely attached to the surface of KU-2 cell and scant in number. Lymphocytes were morphologically characterized by relatively smooth surface and short microvilli. A, reduced from $\times 2,000$. B, reduced from $\times 7,200$.

Fig. 11. Scanning electron microscopic demonstration of KU-2 cell and B cells. Lymphocytes from ERF cell depleted fraction were closely connected with the surface of KU-2 cell and abundant in number. Lymphocytes were morphologically characterized by multiple, rather long microvilli covering almost the entire surface. A, reduced from $\times 3,000$. B, reduced from $\times 7,200$.

Fig. 12. Demonstration of surface marker of B cells by immunofluorescence technique. Lymphocytes from ERF cell depleted fraction, stained with FITC labelled sheep antihuman gammaglobulin showed fluorescence, indicating presence of surface immunoglobulin. Reduced from $\times 900$.

瘍のヌードマウスへの異種移植が試みられつつある。さらにヌードマウスへ異種移植された腫瘍と原腫瘍の相違についても病理学的、内分泌学的および酵素学的見地などから研究がなされ、多くは原腫瘍の生物学的特徴は維持され続けているという報告²¹⁾であるが、これには反論も出て来ている²²⁾。この問題に関する腫瘍免疫学的見地からの研究の報告は少なく今後に残された課題である。しかしながら著者らが CMC に関する実験のために He La 細胞、KU-1 細胞などヌードマウスを経由することなく確立された培養株を標的細胞とした場合にも本実験の CMC の結果と共通した結果を得ているので、KU-2 細胞の免疫学的特徴がヌードマウスを経由していることによつて大きく影響を受けていることは考え難い。

II リンパ球について

正常ヒトリンパ球の個体差が CMC に与える影響は当然考慮されなければならないことである。この問題について Pross らはリンパ球の個体差により CMC が変動することを報告しているが、同一の個体からの正常リンパ球の CMC は比較的安定かつ再現性も高く、またいわゆる健康人と発癌性ウイルスにより感作されている可能性のある研究所職員との間に明らかな差異を認めないことも報告している¹³⁾。著者の実験では健康と判定される男性3名(病院勤務医、年齢28~45歳)と女性1名(病院勤務クラーク)を正常ヒト PBL の供給者としたが Pross らの報告に反して Takasugi らは病院勤務者の CMC により高い細胞障害能がみられることを示唆する

Fig. 13. Demonstration of surface marker of B cells by immunofluorescence technique. Lymphocytes from ERF cell depleted fraction, stained with FITC labelled heat aggregated human IgG showed fluorescence, indicating presence of Fc receptor. Reduced from $\times 400$.

報告をしており⁵⁾、データーの分析に当つてはこの点も一応考慮しなければならないと考える。

III リンパ球の単離法について

EAC ロゼット形成法では SRBC と IgM 抗体との結合が比較的不安定なため B 細胞の回収率を低下させる要素があり、そのため本実験に必要な充分な数の B 細胞の単離に難点があつたため PBL から carbonyl iron powder 処理で macrophage を除去しさらに ERF 法により単離した T 細胞を除いたリンパ球の population を便宜上 B 細胞の画分として用いた。リンパ球の population, subpopulation およびそれらの単離、同定に関しては近年多くの報告があるがその内容に関しては必ずしも統一した見解が打ち出されていない。著者は PBL から macrophage を除去した非 T 細胞画分、すなわち null cell を含む B 細胞を B 細胞画分として使用したが、Chess ら(1975年)はいわゆる null cell は B 細胞の subset であると報告²³⁾していることから本実験においては非 ERF 細胞は B 細胞 predominant であるという理解のもとに検討を進めた。

IV Microcytotoxicity assay

Cytotoxicity の測定には Takasugi & Klein の microcytotoxicity assay⁵⁾、Hellström の colony inhibition assay⁸⁾ および Cr release assay¹⁾ などがある。それらのなかで microcytotoxicity assay は簡便であるのが大きな利点であり、泌尿器科領域における腫瘍免疫学でも免疫能の半定量的測定のために広く用いられており、著者も

この方法を用いた。しかしながら本法を用いた場合の測定値の正確度および再現性は Cr release assay に比べ劣ることは一般に認められている事実であり、定量的比較検討を行う場合のデータの解析にはこの点に留意する必要がある^{24) 25)}。

V CMC の微速度映画下における形態学的観察について

in vitro における細胞性免疫反応 (cell mediated immunity 以下 CMI) の実験の一つの方法として細胞障害の過程を形態学的立場から経時的に追求した報告は文献上極めて少ない。1973年 Kikuchiらは metylcholanthrene induced mouse sarcoma cell を標的細胞として同じ sarcoma で感作された syngeneic mouse からのリンパ球による CMI を微速度映画撮影を含む種々の方法により検討している²⁶⁾。その報告の中で微速度映画撮影についての詳細な記述はないが、培養の条件、観察の時間について著者のそれと大きな相違はないようである。微速度映画撮影による観察で経時変化を量的には勿論のこと質的にも観察可能であると考えられる。なお微速度映画撮影中は閉鎖培養であり通常の 37°C, 5% CO₂, 95% air と培養条件が異なっているので、この変化が形態学上観察された所見を修飾している可能性はある。しかし著者は複数の正常ヒト PBL 供給者のリンパ球についても微速度映画による経時的形態学的観察を行ったが極めて類似した所見を得ているのでこの実験系の再現性は充分あると考えている。

VI 細胞表面構造の形態学的観察

走査型電子顕微鏡による培養腫瘍細胞、リンパ球など個々の細胞の微細な表面構造の高倍率下での立体的観察は近年の走査型電子顕微鏡の性能と技術的改良に負うところ大なるものであり、それに関する報告も多い^{27) 28)}。免疫機序解明のために、細胞表面の微細構造および effector cell と標的細胞の反応をより dynamic に観察することは重要なことで、そのために走査型電子顕微鏡の果たす役割は大きいと考える。本実験において著者は走査型電子顕微鏡を用いて SLMC における effector cells と標的細胞の反応の立体的観察から、B細胞の形態学的特徴を持った多数の effector cells が標的細胞に極めて密に接している所見を得た。この所見は SLMC における B細胞の細胞障害機序として、細胞-細胞結合の直接的関与を示唆するものと著者は考えている。

VII FITC 標識血清による effector cell の同定

リンパ球の単離法で述べた理由により著者は ERF 細胞

は T細胞, PBL より macrophage および ERF 細胞を除去したリンパ球画分は B細胞 predominant であるという理解のもとに実験を進めたが、PBL より macrophage および ERF 細胞を除去したリンパ球画分は蛍光顕微鏡による観察により surface Ig 陽性、Fc receptor 陽性のリンパ球であるという結果を得た。リンパ球の種々の細胞表面マーカーの相違により T細胞および B細胞 population を分離しようとする試みは広く行われており、Fc receptor に関してはそれは B細胞以外には null cell²⁹⁾ および low affinity ERF 細胞³⁰⁾ の細胞表面マーカーであり、surface Ig に関してはそれは B細胞の細胞表面マーカー³¹⁾ であるというのが今日の一般的見解である。本実験において SLMC の effector cell は Fc receptor, surface Ig の両方の細胞表面マーカーを有することにより B細胞の特徴を備えた細胞であると考えられた。

VIII 実験結果について

PHA induced cytotoxicity は Holm³²⁾ らによる1964年以來の一連の報告以後は1977年島らの研究¹⁷⁾ 以外には最近では比較的報告が少ないようである。著者は KU-2 細胞を標的細胞として正常ヒト PBL, 単離 T細胞, 単離 B細胞および各々が PHA により刺激された場合に異なる細胞障害能を生ずることを microcytotoxicity assay による検討ならびに微速度映画撮影による形態学的観察によつて確認することができた。細胞障害能の程度に関しては PHA 刺激 PBL と PHA 刺激単離 T細胞の両者が最も高度であり、PHA 非刺激リンパ球においては単離 B細胞, PBL, 単離 T細胞の順序であつた。ここまでにおいては microcytotoxicity assay による % cytotoxicity の値と微速度映画撮影での cytotoxic effect は極めてよく並行していた。しかるに PHA 刺激 B細胞の細胞障害能に関しては不一致がみられた。すなわち % cytotoxicity では高い細胞障害能がみられたにもかかわらず、微速度映画撮影による形態学的観察ではそれに匹敵する cytotoxic effect は観察しえなかつた。本研究においては macrophage を除去しているものの T細胞の subset については検討していないので決定的な結論はしえないが PHA-induced cytotoxicity は PBL でも T細胞でも同程度にみられたということから前者においても T細胞が主たる effector cell であることが考えられた。いわゆる SLMC が PHA 非刺激単離 T細胞にはなく、PHA 非刺激単離 B細胞および PHA 非刺激 PBL にみられ、かつ PHA 非刺激単離 B細胞により高い細胞障害能がみられたということは、effector cell 対標的細胞の比が 50 : 1

といつても PHA 非刺激単離 B 細胞 population のみを effector cell とした場合は相対的に B 細胞の数が多くなっていることに起因していると考えられ、このことから SLMC の effector cell は PHA 非刺激 B 細胞であることが想定された。PHA 刺激 B 細胞の細胞障害能に関しては高い % cytotoxicity に匹敵する微速度映画撮影下での cytotoxic effect が認められなかつたのは微速度映画撮影で観察された空胞形成、細胞膜崩壊をきたした KU-2 細胞の一部が % cytotoxicity 検定のための操作の過程で外力を加えることにより nonadherent cell と一緒に脱落したことが考えられる。PHA 非刺激単離 B 細胞の cytotoxic effect が PHA 刺激単離 B 細胞のそれより高いことが微速度映画撮影で観察されたがその解釈として著者は次の点を想定している。すなわち B 細胞に存在する PHA および KU-2 細胞に対する receptor の関与の可能性についてである。B 細胞は PHA により活性化されないというのが一般的見解であるが B 細胞は 5 日間にわたる PHA との反応後に活性化するという報告³³⁾もあり、B 細胞にも PHA に対する receptor が存在することは充分想定される。もし B 細胞表面の PHA に対する receptor と KU-2 細胞に対する receptor が近接しているか、あるいは類似しているものであれば PHA との preincubation により B 細胞—PHA 複合体がつくられるために、KU-2 細胞との結合が抑制されることが考えられる。そしてこの B 細胞—PHA 複合体によつて KU-2 細胞の破壊過程の抑制あるいは遅延することが前述の PHA 刺激単離 B 細胞における microcytotoxicity assay と、微速度映画撮影による観察結果の不一致の原因となつていると考えられた。

本研究において B 細胞および PBL に相当高い細胞障害能が確認されたことは、後者における effector cell が B 細胞あるいはその subpopulation が主要な役割を果している可能性を強く示唆するものである。SLMC の effector cell の同定に関しては最近多くの報告がある。Hersey が 1975 年に SLMC の effector cell は活性化 T 細胞 (activated T cell) であるという報告²⁴⁾をしているのを除いては、de Vries¹⁴⁾ (1974 年) は補体 receptor を有する非 T 細胞とし、Pross & Jondal¹³⁾ (1975 年) は補体および Fc receptor を有する非 T 細胞とし、Kiuchi & Takasugi²⁹⁾ (1976 年) および Bakacs³⁵⁾ (1977 年) はいずれも Fc receptor を有する細胞と報告しており、非 T 細胞が SLMC の effector cell であるというのが今日の一般的見解のようである。しかしながら 1977 年に

West は今日までの様々な SLMC の effector cell の同定に関する報告をリンパ球を単離する過程における種々の条件の相違の立場から再検討している³⁰⁾。第一の問題点は ERF 細胞は E ロゼット形成の温度の違いにより low affinity E-rosette forming cell (4°C) と high affinity E-rosette forming cell (29°C) に区別され、前者は Fc receptor 陽性、後者は陰性であると報告されていることである。West は事実 29°C においては SLMC の effector cell を非 ERF 細胞画分に、4°C あるいは neuraminidase 処理においては ERF 細胞画分に認められると報告している。第 2 の問題点は細胞障害能測定の前 T 細胞を SRBC から遊離させるためアンモニウムクロライド緩衝液で SRBC を溶血することは、細胞障害能を著しく低下させるということである。こうした観察より West も SLMC の effector cell は非 T 細胞であるという一般見解を否定し、Fc receptor 陽性で SRBC と低い親和性を持つ分化過程にある T 細胞の subpopulation であると報告している。リンパ球の単離のための技術が進歩すればより純度の高いリンパ球の単離が可能であると考えられるが、一方においてはそれに伴つて起こりうるリンパ球の活性への影響、試薬および抗体の純度がある画分を他の画分から分離する過程で与える影響は充分に考慮されねばならないと考える。事実 West も SLMC の effector cell は補体 receptor 陽性であると強く主張する Jondal の報告に対し IgG を混在している抗ヒツジ赤血球抗体を EAC ロゼット形成のために使用している点を指摘し、そのため B 細胞以外の Fc receptor 陽性の細胞を除去する結果になると反論している。1976 年 Takasugi らは CMC の effector cell の同定に関する報告の中でも、遠心操作が EAC ロゼット形成に与える影響に関して、遠心操作は EA ロゼット形成をも誘発し、そのため B 細胞以外の Fc receptor 陽性細胞が EAC ロゼット形成細胞画分に混在する可能性を指摘している。さらにその報告の中で、1973 年の Takasugi らによる正常ヒトリンパ球の細胞障害能についての報告に引き続きなされた CMC に関する一連の研究結果の総括として、正常リンパ球に認められる細胞障害能の effector cell は null cell であると表現されている。しかし null cell に関する詳細な研究が進むにつれ null cell は B 細胞の subpopulation であるとの報告もあり³⁶⁾、その分類に関しては今後さらに検討がなされるのは必至と思われる。

正常ヒトリンパ球の腎腺癌由来腫瘍細胞株を標的細胞とした場合の細胞障害に関与する effector cell 同定のた

め、著者は技術的にみて比較的簡単でかつ回収率の高い ERF 法を用いることにより macrophage 除去リンパ球を T 細胞と B 細胞に分離した。Microcytotoxicity assay および微速度映画撮影による形態学的観察により、B 細胞が関与している所見を得、さらに走査型電子顕微鏡による微細形態学的見地 および FITC を用いての細胞表面マーカーの特徴的性状の確認により正常ヒトリンパ球の腫瘍細胞株 KU-2 に対する SLMC には B 細胞として特徴づけられるリンパ球が effector cell として関与していることを実証した。

結 語

ヒト腎腺癌由来腫瘍細胞株 KU-2 細胞を標的細胞とした場合の正常ヒトリンパ球の細胞障害能を microcytotoxicity assay で検討し、さらに微速度映画撮影による経時的観察、走査型電子顕微鏡および蛍光顕微鏡の所見により以下の結論を得た。

- 1) 正常ヒト PBL の細胞障害能が確認された (SLMC)。
- 2) 正常ヒト PBL の PHA-induced cytotoxicity が確認された。
- 3) ERF 法により単離された T 細胞のみでは細胞障害は欠如していた。
- 4) 単離 T 細胞の PHA-induced cytotoxicity は PBL の PHA-induced cytotoxicity を反映していることを確認した。
- 5) PBL より macrophage を除きさらに ERF 法により T 細胞を除いたリンパ球は比較的高度の細胞障害能を持ち (SLMC)、そのリンパ球は走査型電子顕微鏡および蛍光顕微鏡による所見より、多数の長い microvilli の存在、surface Ig 陽性、Fc receptor 陽性に特徴づけられるリンパ球で B 細胞であることの可能性が確認された。
- 6) PHA 刺激 B 細胞の細胞障害能においては microcytotoxicity assay による % cytotoxicity と、微速度映画撮影による形態学的観察での cytotoxic effect との間に一致がみられなかつた。
- 7) PHA 刺激 PBL の細胞障害は、T 細胞の PHA-induced cytotoxicity と B 細胞の SLMC の両者が関与していると考えられる。

本論文の要旨は第36回日本癌学会総会、第66回日本泌尿器科学会総会および第 378回日本泌尿器科学会東京地方会において発表した。稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜った恩師田崎寛教授、終始

直接御指導下さった晶亮講師に心より感謝の意を表します。また御協力戴いた村井勝講師、木下英親、早川正道両博士、並びに当大学医学部内科学教室栗田健博士に感謝します。さらに実験に御協力戴いた古屋修氏に厚く御礼を申し上げます。

なお本研究の一部は昭和52年度53年度文部省科学研究費一般研究課題番号248294および昭和53年度文部省科学研究費奨励研究 A 課題番号377482によって行われた。

文 献

- 1) Bloom, H.J.G.: Hormone-induced and spontaneous regression of metastatic renal cancer. *Cancer*, **32**, 1066—1071, 1973.
- 2) Katsuoka, Y., Baba, S., Hata, M. and Tazaki, H.: Transplantation of human renal cell carcinoma to the nude mice: As an intermediate of in vivo and in vitro studies. *J. Urol.*, **115**, 373—376, 1976.
- 3) 勝岡洋治: Nude mouse 移植と培養細胞系を応用したヒト腎細胞癌の機能と形態に関する研究。日泌尿会誌, **69**, 285—303, 1978.
- 4) Boyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **21**, Supple., **97**, 77—89, 1968.
- 5) Takasugi, M. and Klein, E.: A microassay for cell mediated immunity. *Transplantation*, **9**, 219—227, 1970.
- 6) Foley, E.J.: Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.*, **13**, 835—837, 1953.
- 7) Sjögren, H.O., Hellström, I. and Klein, G.: Transplantation of polyoma virus-induced tumors in mice. *Cancer Res.*, **21**, 329—337, 1961.
- 8) Hellström, I.: A colony inhibition (CI) technique for demonstration of tumor cell destruction by lymphoid cells in vitro. *Int. J. Cancer*, **2**, 65—68, 1967.
- 9) Elhilali, M.M. and Nayak, S.K.: Immunologic evaluation of human bladder cancer: In vitro studies. *Cancer*, **35**, 419—431, 1975.
- 10) Hellström, I., Hellström, K.E., Sjögren, H.O. and Warner, G.A.: Demonstration of cell-mediated immunity to human neoplasms of various histological types. *Int. J. Cancer*, **7**, 1—16, 1971.
- 11) Cummings, K.B., Peter, J.B. and Kaufman, J.J.: Cell-mediated immunity to tumor antigens in patients with renal cell carcinoma. *J. Urol.*, **110**, 31—35, 1973.
- 12) Takasugi, M., Mickey, M. and Terasaki, P.I.: Reactivity of lymphocytes from normal persons

- on cultured tumor cells. *Cancer Res.*, **33**, 2898-2902, 1973.
- 13) Pross, H.F. and Jondal, M.: Cytotoxic lymphocytes from normal donors. *Clin. Exp. Immunol.*, **21**, 226—235, 1975.
 - 14) Herberman, R.B., Nunn, M.E. and Lavrin, D.H.: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. 1. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer*, **16**, 216—229, 1975.
 - 15) Takasugi, M., Mickey, M.R. and Terasaki, P.I.: Studies on specificity of cell-mediated immunity to human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, **53**, 1527—1538, 1974.
 - 16) de Vries, J.E., Cornalin, S. and Rumke, P.: Cytotoxicity of non-T versus T-lymphocytes from melanoma patients and healthy donors on short- and long-term cultured melanoma cell. *J. Cancer*, **14**, 427—434, 1974.
 - 17) 畠 亮, 青木清一, 実川正道, 吉田叔子, 田崎 寛, 森実敏夫: PHA 刺激リンパ球の細胞障害能; 第1報その理論と臨床的意義. *日泌尿会誌*, **68**, 225—230, 1977.
 - 18) Hakala, T.R., Lange, P.H., Castro, A., Elliott, A. and Fraley, E.E.: Cell-mediated cytotoxicity against human transitional cell carcinomas of the genitourinary tract. *Cancer*, **34**, 1929—1934, 1974.
 - 19) 加藤哲郎, 石川 清, 根本良介: ヒト膀胱癌由来樹立細胞株 T24 ならびに MGH-UI の形態学的研究. *日泌尿会誌*, **69**, 40—46, 1978.
 - 20) Rygaard, J. and Povlsen, C.O.: Heterotransplantation of a human malignant tumor to nude mice. *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, **77**, 758—760, 1969.
 - 21) Taguchi, T., Fujita, M. and Usugane, M.: Heterotransplantation of various human and canine tumors into nude mice. in *Proc. 2nd Int. Workshop in NUDE MICE*, p. 305, Univ. of Tokyo Press, Tokyo, 1977.
 - 22) Hirohashi, S., Shimosato, Y., Kameya, T., Koide, T., Mukojima, T. and Taguchi, Y.: Morphological and functional aspects of human liver cell carcinomas transplanted in nude mice. *ibid.* p. 427, 1977.
 - 23) Chess, L., Levine, H., MacDermott, R.P. and Schlossman, S.F.: Immunologic functions of isolated human lymphocyte subpopulations. VI. Further characterization of the surface Ig negative, E rosette negative (null cell) subset. *J. Urol.*, **115**, 1483—1487, 1975.
 - 24) Herberman, R.B. and Oldham, R.K.: Problems associated with study of cell-mediated immunity to human tumors by microcytotoxicity assays. *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**, 749—753, 1975.
 - 25) Oldham, R.K., Djeu, J.Y., Cannon, G.B., Siwarski, D. and Herberman, R.B.: Cellular microcitotoxicity in human tumor systems: Analysis of results. *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**, 1305—1318, 1975.
 - 26) Kikuchi, K., Reiner, J. and Southam, C.M.: Cell-mediated tumor specific immune reactions: In vitro demonstration. *Gann*, **51**, 321—327, 1970.
 - 27) 高橋清之, 足達敏博, 藤岡満喜夫, 翠川 修: 培養細胞の表面構造. 代謝, 14, 図譜, 1977.
 - 28) Polliack, A., Lampen, N., Clarkson, B.D. and de Harven, E.: Identification of human B and T lymphocytes by scanning electron microscopy. *J. Exp. Med.*, **138**, 607—624, 1973.
 - 29) Kiuchi, M. and Takasugi, M.: The nonselective cytotoxic cell (N cell). *J. Natl. Cancer Inst.*, **56**, 575—582, 1976.
 - 30) West, W.H., Cannon, G.B., Kay, H.D., Bonnard, G.D. and Herberman, R.B.: Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: Characterization of effector cells. *J. Immunol.*, **118**, 355—361, 1977.
 - 31) Thaler, M.S., Klausner, R.D. and Cohen, H.J.: *Medical Immunology*, 1st ed., p. 54, J.B. Lippincott Co., Philadelphia Toronto, 1977.
 - 32) Holm, G., Perlmann, P. and Werner, B.: Phytohemagglutinin-induced cytotoxic action of normal lymphoid cells on cells in tissue culture. *Nature*, No. 4947, 841—843, 1964.
 - 33) Chess, L., MacDermott, R.P. and Scholssman, S.F.: Immunologic functions of isolated human lymphocyte subpopulations. 1. Quantitative isolation of human T and B cells and response to mitogens. *J. Immunol.*, **113**, 1113—1121, 1974.
 - 34) Hersey, P., Edwards, A., Edwards, J., Adams, E., Milton, G.W. and Nelson, D.S.: Specificity of cell-mediated cytotoxicity against human melanoma lines: Evidence for "non-specific" killing by activated T-cells. *Int. J. Cancer*, **16**, 173—183, 1975.
 - 35) Bakacs, T., Gergely, P., Cornain, S. and Klein, E.: Characterization of human lymphocyte subpopulations for cytotoxicity against tumor-derived monolayer cultures. *Int. J. Cancer*, **19**, 441—449, 1977.
 - 36) Haegert, D.G.: Observations on the number of immunoglobulin-bearing lymphocytes in human peripheral blood with the mixed antiglobulin-rosetting reaction and direct immunofluorescence. *J. Immunol.*, **120**, 124—129, 1978.

(1978年6月27日受付, 特別掲載)