

悪性神経膠腫に対する特異的キラー T 細胞の誘導

東京医科大学脳神経外科学教室 (指導: 伊東 洋主任教授)

齋 藤 公 男

【要旨】 近年悪性神経膠腫に対しても LAK 療法が広く行われている。しかし本法では抗原特異性を有さず、十分なキラー活性を得がたい。一方、CTL は抗原特異性を有するがその誘導は困難であり、確立された誘導法は無い。本研究ではウィスターラット系を用い C6 神経膠腫に対して特異的な CTL の誘導を試みた。キラー T 細胞は放射線照射を行った C6 神経膠腫細胞を腹腔内投与して免疫 (*in vivo priming*) した後にリンパ球を採取し、*in vitro* で同細胞および Interleukin-2 の存在下に二次刺激を加えることによるのみ得られた。*In vivo priming* のみ、もしくは二次刺激のみでは得られなかった。得られたキラー細胞は C6 神経膠腫細胞に対して高いキラー活性を示したが異種神経膠腫細胞である 9L 神経膠腫細胞に対しては活性を示さなかった。リンパ球表面抗原は CD3 陽性、CD4 陰性、CD8 陽性であった。以上より CD8 陽性 C6 神経膠腫特異的 CTL が誘導されたものと思われた。

はじめに

悪性神経膠腫は現在手術が主治療となっているが、放射線療法や化学療法などの補助的手段を駆使しても、生命予後は不良である。すなわち腫瘍が浸潤性に発育すること、術後の神経機能障害等により根治手術が可能な症例は少ない¹⁾。放射線療法として用いられる局所線量 (50~60 Gy) では十分な効果を得ることは困難である。しかし放射線量を増加させると放射線壊死等の正常脳への副作用もあり、根治は不可能である²⁾。脳には血液脳関門 (BBB) が存在するため抗腫瘍薬の使用には制限がある。現在主にニトロソウレア系薬剤が全身投与されているが、消化器症状、骨髄抑制、腎障害等の全身性の副作用に加えて、腫瘍自体の薬剤耐性獲得³⁾⁴⁾の問題も指摘されている。

近年の免疫学の進歩により、腫瘍細胞にたいして破壊作用を示すキラー細胞が誘導されることが明らかにされ、一部の症例では *in vivo* においても有効であることが報告されている^{5)~8)}。Rosenberg ら⁵⁾ はリンパ球を Interleukin-2 (IL-2) と共に培養することにより、容易にキラー細胞 (LAK 細胞) を誘導することに成功した。しかしながら、これらの細胞

は特異性を有していないため、腫瘍細胞破壊には大量の細胞が必要である。また大量の IL-2 を同時に投与するため capillary leak syndrome 等の副作用⁹⁾¹⁰⁾ を避けることも困難である。このような状況により、抗原特異性をもち、かつ抗腫瘍活性を保有しているキラー T 細胞の誘導法の確立が望まれてきた。筆者はラット脳腫瘍細胞をモデル系として用い、腫瘍細胞を選択的に破壊するキラー T 細胞 (Cytotoxic T Lymphocyte: 以下 CTL と略す) の誘導法について基礎的研究を試み、意義ある成績を得たので報告する。

方 法

1. 動物及び細胞株

生後 8 週前後の雄のウィスターラットを用いた。腫瘍細胞株はウィスターラットにエチルニトロソウレアを用いて誘発したグリア由来の腫瘍株である C6 神経膠腫¹¹⁾ 及び、フィッシャー 344 ラットで同様に誘発した 9L 神経膠腫¹²⁾ を用いた。

2. 試薬

IL-2 はラット脾細胞を phytohemagglutinin (PHA) で 48 時間刺激後に得た培養上清であり、免疫生物学研究所 (東京) より購入した。

1995 年 6 月 26 日受付, 1995 年 9 月 8 日受理

キーワード: 悪性神経膠腫, 免疫療法, 細胞障害性 T リンパ球。

(別刷請求先: 〒160 新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学脳神経外科学教室 齋藤公男)

マウス IgM ラット抗 CD3 抗体, マウス IgG 2 ラット抗 CD4 抗体及びマウス IgG 2 ラット抗 CD8 抗体, FITC 標識ウサギ抗マウス IgM 抗体及び PE 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体は生化学工業 (東京) より購入した。

3. 腫瘍細胞によるラットの感作

6000 rad の放射線照射によって不活化された C6

神経膠腫細胞を生理食塩水で $1 \times 10^6 / \text{ml}$ に調整し, これを 1 日目及び 15 日目に 2 回腹腔内に接種することにより C6 神経膠腫感作ラットを作成した。

4. ラットリンパ球の調整及びキラー T 細胞の誘導

Fig. 1 にラットリンパ球の調整及びキラー T 細胞の誘導法を示す。最終感作 1 週間後 (21 日目) の

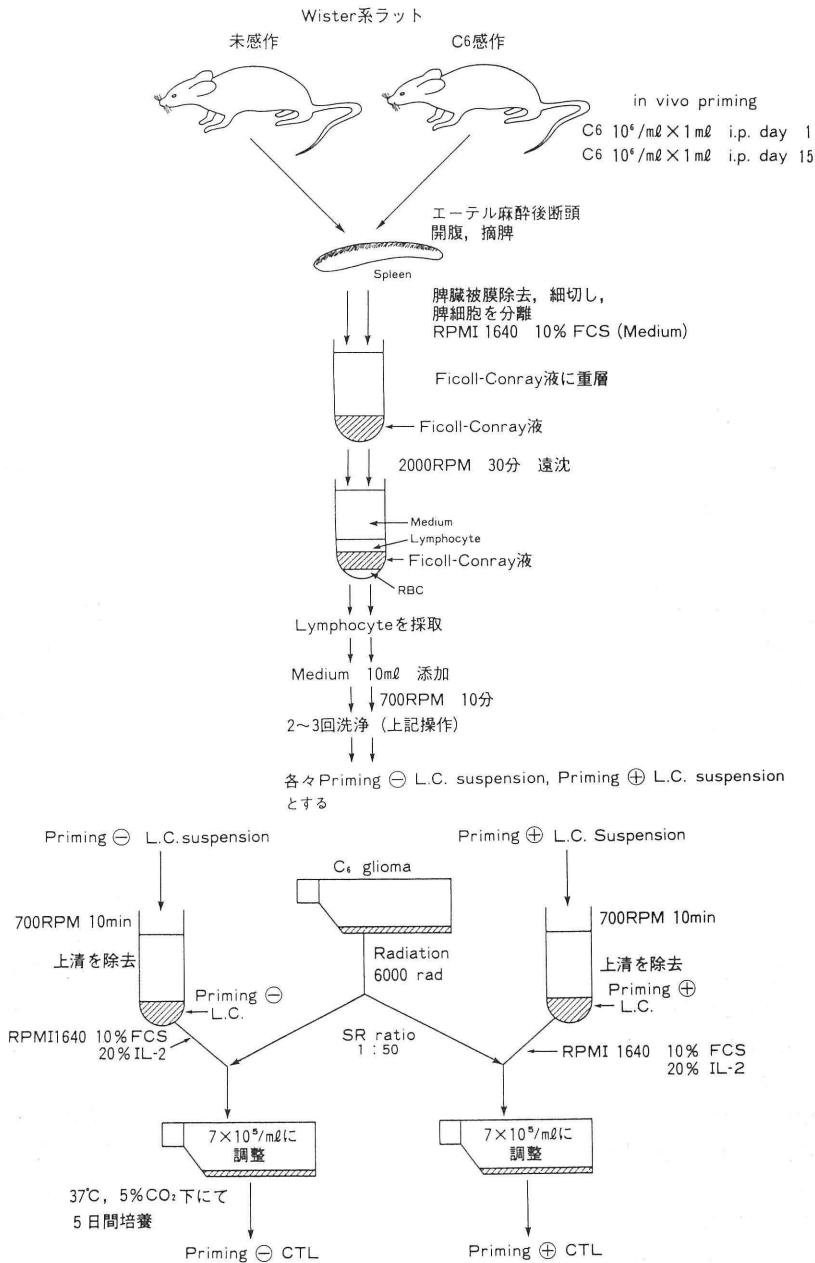


Fig. 1 ラットリンパ球の分離および CTL の誘導法

C6 神経膠腫感作 (Priming+) ラットを, エーテル麻酔の後, 断頭, 開腹して脾臓を摘出した。脾臓被膜を除去した後, RPMI 1640 培地 (GIBCO, Grand Island, N.Y.) に 10% の胎児ウシ血清, 5×10^{-5} M の 2-メルカプトエタノールを加えた培地内で細切し脾細胞浮遊液を作成した。対照には未感作 (Priming-) ラットを用いた。これを Ficoll-Conray 比重遠心法を用いリンパ球を分離採取し, それぞれ感作リンパ球 (Priming+LC), 未感作リンパ球 (Priming-LC) とした。

未感作リンパ球及び感作リンパ球を前述の培地に IL-2 を 20% 加えた完全培地で放射線照射処理を行った C6 神経膠腫細胞とリンパ球を 1:50 の割合で混合し, 37°C , 5% CO_2 の条件下で 5 日間静置培養し, それぞれを未感作リンパ球由来 CTL (Priming-CTL), 感作リンパ球由来 CTL (Priming+CTL) とした。

5. キラー T 細胞の腫瘍増殖抑制効果 (*in vitro*)

a) 倒立顕微鏡による検討

24-ウェルプレートに, C6 神経膠腫細胞のみ ($5 \times 10^6/0.5$ ml), 同数の C6 神経膠腫細胞に未感作リンパ球由来 CTL あるいは感作リンパ球由来 CTL を 1:10 の割合で加えたものを, 37°C , 5% CO_2 の条件下で 48 時間培養し倒立顕微鏡にて検鏡した (Fig. 2)。

b) ^{51}Cr 遊離法による殺細胞試験

標的細胞 (C6 神経膠腫細胞及び 9L 神経膠腫細胞) を $1.5 \times 10^6/0.3$ ml に調整し, ^{51}Cr 溶液 $100 \mu\text{Ci}$ にて 1 時間培養した後完全培地で $1 \times 10^5/\text{ml}$ に調整した。

96-ウェルプレートに標的細胞として C6 神経膠腫細胞あるいは 9L 神経膠腫細胞を 1 ウェルあたり $1 \times 10^4/0.1$ ml に分注した。次に未感作リンパ球, 感作リンパ球, 未感作リンパ球由来 CTL 及び感作リンパ球由来 CTL を標的細胞に対して 1:1, 1:5, 1:25, 1:100 の割合で加えた。 37°C 5% CO_2 にて 4 時間培養した後上清を回収し, γ カウンターで上清中の放射線活性を測定した。標的細胞に完全培地のみを加えて培養したものをバックグラウンド cpm とし, 標的細胞に 2% NP 40 を 0.1 ml 加え培養したものを最大 cpm とした。キラー活性は (サンプル cpm-バックグラウンド cpm) \div (最大 cpm-バックグラウンド cpm) $\times 100$ として求めた。

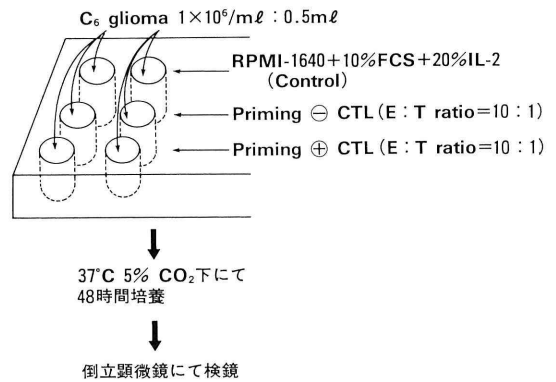


Fig. 2 キラー T 細胞の腫瘍増殖抑制効果 (*in vitro*)
～倒立顕微鏡による検討～

6. フローサイトメーターによるリンパ球表面抗原の解析

キラー T 細胞上の CD3, CD4, CD8 分子の染色は従来よりの方法にしたがって間接法を用いて行った¹³⁾。すなわちキラー T 細胞を, CD3 および CD4 あるいは CD3 および CD8 の一次抗体により 60 分間, 4°C 下に反応させた後磷酸緩衝液にて十分洗浄した。次に二次抗体 (FITC 標識ウサギ抗マウス IgM 抗体および PE 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体) を用い 60 分間, 4°C 下で同様に反応させ, 磷酸緩衝液にて洗浄後, アルコール固定を行った。各々の細胞の蛍光強度は FAC-Scan を用いて測定した。

7. キラー T 細胞の腫瘍増殖抑制効果 (*in vivo*)

BALB/C ヌードマウスの皮下に 1×10^6 個の C6 神経膠腫細胞を移植したものを対照とし, C6 神経膠腫細胞に 1×10^7 個の未感作リンパ球由来 CTL 及び感作リンパ球由来 CTL を加えて (キラー細胞: 標的細胞 = 10:1) 移植した。移植腫瘍の大きさを 72 時間毎に経時的に測定した。移植腫瘍の短径と長径の積を腫瘍容積の指標とした。

結 果

1. キラー T 細胞の腫瘍増殖抑制効果 (*in vitro*)

a) 倒立顕微鏡による検討

C6 神経膠腫細胞と 48 時間混合培養後の倒立顕微鏡写真を Fig. 3 に示す。上段左の対照及び下段左の未感作リンパ球由来 CTL では紡錘形状をした C6 神経膠腫細胞の増殖が著しかった。一方上段右の感作リンパ球由来 CTL では腫瘍細胞は殆ど存在せず, 下段右に示すように一部残存する腫瘍細胞に対

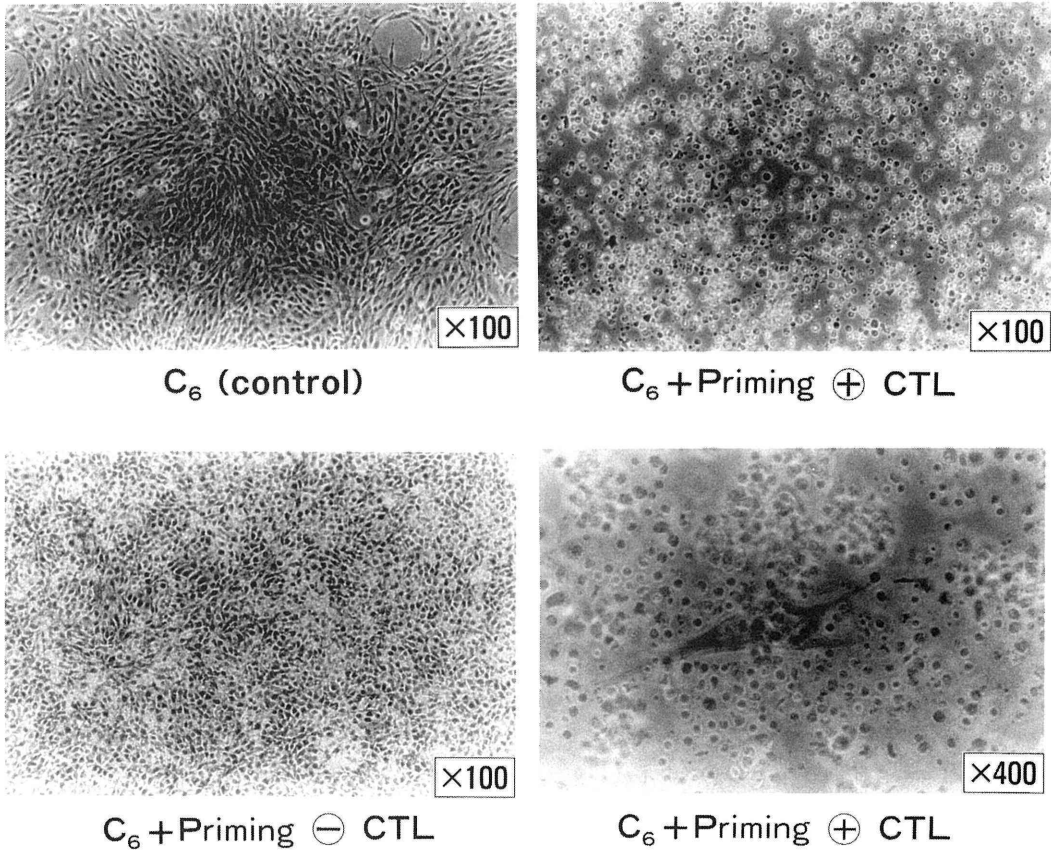


Fig. 3 キラー T 細胞の腫瘍増殖抑制効果 (*in vitro*)
 ～倒立顕微鏡による検討～(E:T=10:1)

Control および Priming-CTL では紡錘形状をした C6 神経膠腫細胞が一面に増殖するが、Priming+CTL では腫瘍細胞は殆ど増殖せず、一部残存する腫瘍細胞に対しても Priming+CTL が多数付着して腫瘍細胞を障害している。

しても感作リンパ球由来 CTL が多数付着して腫瘍細胞を障害していた。

b) ⁵¹Cr 遊離法による殺細胞試験

⁵¹Cr 遊離法による殺細胞試験の結果を Fig. 4 に示す。未感作リンパ球、感作リンパ球および未感作リンパ球由来 CTL は C6 神経膠腫細胞、9L 神経膠腫細胞の両者に対するキラー活性はなかった。しかしながら感作リンパ球由来 CTL は C6 神経膠腫細胞に対してキラー T 細胞: 標的細胞比の上昇と同時に高いキラー活性を示し、その比が 100:1 では約 80% の高いキラー活性を示した。一方、9L 神経膠腫細胞に対してはキラー活性を認めなかった。以上のことより本実験で誘導されたキラー T 細胞は明らかに抗原特異性を有していた。

2. キラー T 細胞の表面抗原の解析

2 カラー解析を用いて未感作及び感作リンパ球由来 CTL の CD3, CD4, CD8 マーカーについて検討した (Fig. 5)。CD3, CD4 両陽性細胞の比率は、未感作リンパ球由来 CTL では 27.57%、感作リンパ球由来 CTL では 25.12% と両者間に有意差認めなかった。一方 CD3, CD8 両陽性細胞の比率は未感作リンパ球由来 CTL では 13.54% であるのに対して感作リンパ球由来 CTL では 29.17% と有意な上昇を示した。すなわち、*in vitro* で培養された細胞は CD8 陽性 T 細胞であることが示唆された。

3. キラー T 細胞の腫瘍増殖抑制効果 (*in vivo*)

Fig. 6 に腫瘍細胞移植後 2 週間のヌードマウスを示す。対照群及び未感作リンパ球由来 CTL 投与群では小指頭大の腫瘍形成が認められた。一方感作リ

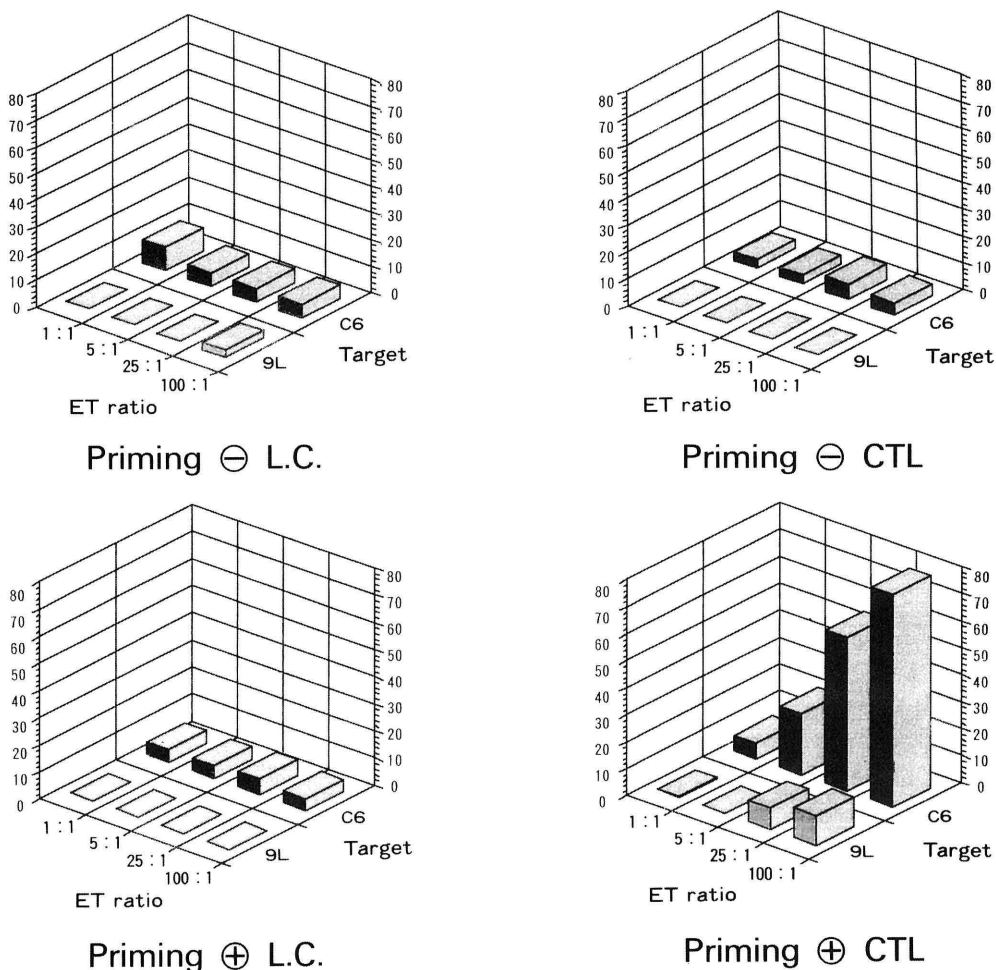


Fig. 4 ⁵¹Cr 遊離法による殺細胞試験

Priming-リンパ球, Priming+リンパ球および Priming-CTL では C6 神経膠腫細胞, 9L 神経膠腫細胞ともにキラー活性を示さない. Priming+CTL は C6 神経膠腫細胞に対して E:T ratio の上昇とともに高いキラー活性を示し, 100:1 では約 80% のキラー活性を示す. 9L 神経膠腫細胞に対してはキラー活性を示さない.

リンパ球由来 CTL 投与群では腫瘍形成は認めなかった.

さらに腫瘍の大きさを経時的に観察し, 短径と長径の積で示したグラフを Fig. 7 に示した. 腫瘍細胞移植後 3 週間では未感作リンパ球由来 CTL 投与群は対照群と比較して腫瘍増殖に対し肉眼的には影響は与えなかった. 一方感作リンパ球由来 CTL 投与群は腫瘍細胞移植後 2 週間までは腫瘍形成の抑制を認めた. しかし, それ以後では腫瘍増殖が観察された. すなわち本実験よりキラー T 細胞がヌードマウスの腫瘍細胞を部分的に増殖抑制した結果を得た.

考 察

1. LAK 療法とその問題点

1985 年に Rosenberg ら⁵⁾ は LAK 細胞を用いた養子免疫療法を報告した. その後 157 例の悪性腫瘍に対して本法を用い 33 例 (腎癌, 悪性黒色腫等) が有効であったと報告した⁶⁾. 一方, 中枢神経系腫瘍に対して Jacobs ら⁷⁾ は 9 例の悪性神経膠腫に対し局所投与の第 1 相試験を行ったが満足な結果は得られなかった. 本邦においては吉田ら⁸⁾ は 23 例の再発 glioma に局所投与を行い 6 例に腫瘍縮小効果を認

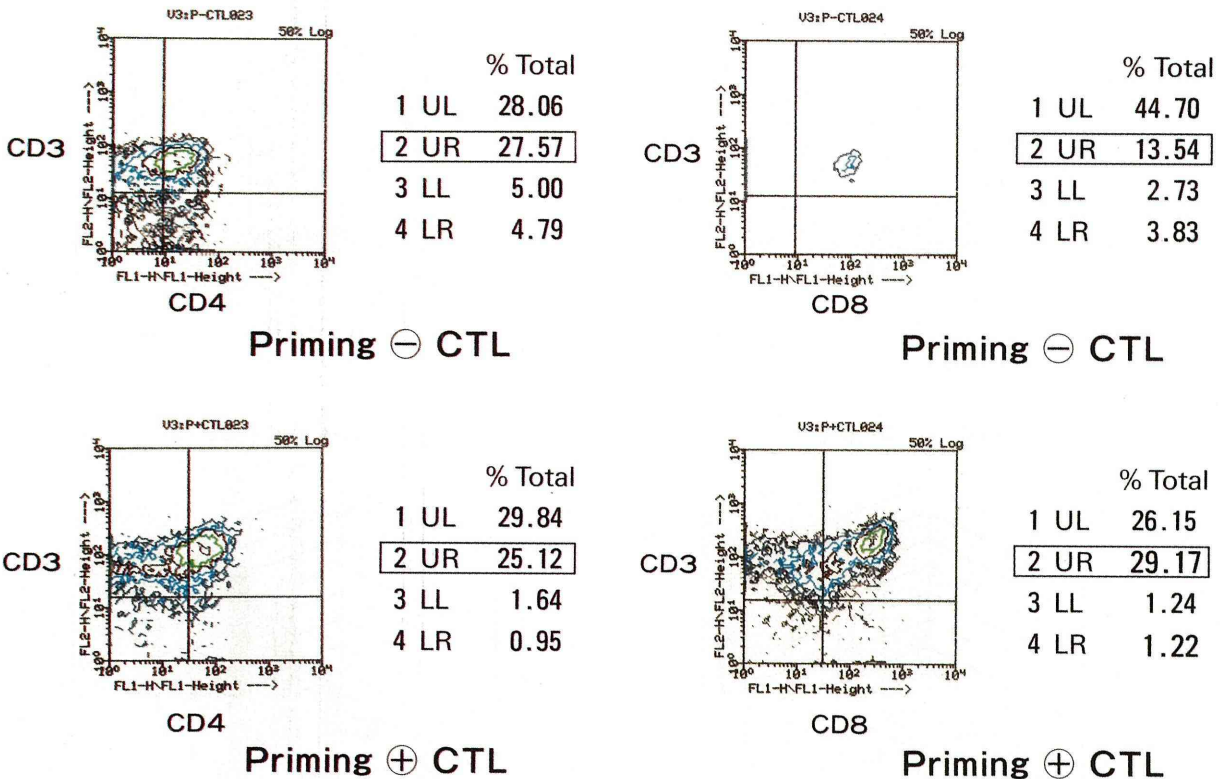


Fig. 5 フローサイトメーターによるリンパ球表面抗原の解析
Priming+CTL では CD3, CD8 両陽性細胞の割合が Priming-CTL に比して有意に上昇した。

めた。この方法に用いられる LAK 細胞は IL-2 とともにリンパ球を培養することにより比較的簡単に *in vitro* において誘導された。しかし、LAK 細胞は抗原非特異的細胞であるため、十分なキラー活性が得られない欠点があった。また、LAK 細胞は全身投与方法では主に肺、肝臓、脾臓に集積する¹⁴⁾ため、多量の LAK 細胞が血液脳関門を通過して脳腫瘍細胞へ到達することが困難と言われている¹⁵⁾。この生理学的な欠点に対し新田ら¹⁶⁾は抗 CD3 抗体と神経膠腫細胞と反応する LU 246 抗体 (マウス IgG 1) のそれぞれを消化して F (ab')₂ とし、これをチオール活性化剤 DTNB によって架橋した “bi-specific antibody” を考案した。しかし、マウス抗体のためヒト抗マウス抗体 (HAMA) 形成の問題を残した¹⁷⁾¹⁸⁾。

局所投与では LAK 細胞投与後早期に投与腔表面に肉芽組織が形成され、以後 LAK 細胞を大量に何回投与を試みても肉芽組織を通過してさらに深部の

腫瘍細胞に到達することが不可能と考えられた¹⁵⁾。

2. CTL の誘導法

藤本¹⁹⁾、北原²⁰⁾らは悪性腫瘍に対して坦癌患者末梢リンパ球をマイトマイシン C で処理した自家腫瘍細胞と混合培養し、腫瘍細胞に特異的なキラー T 細胞 (CTL) を用いその有効性を報告した。しかし、現時点では CTL の誘導法に関して確立された方法がない。特に腫瘍関連抗原の発現性が弱い脳腫瘍ではその誘導が困難なことが多い。今回の実験ではエチルニトロソウレアで誘導されたラット神経膠腫 (C6 神経膠腫) 細胞に対して特異的に反応するキラー T 細胞を誘導することが可能となった。本法は放射線照射された C6 神経膠腫細胞をラットの腹腔内に投与しラットを感作した。この感作ラットのリンパ球を *in vitro* で抗原刺激を与えつつ IL-2 存在下に培養することによりキラー活性をもった細胞が得られた。しかし、感作リンパ球それ自身あるいは未感作リンパ球を IL-2 で培養した場合にはキラー活

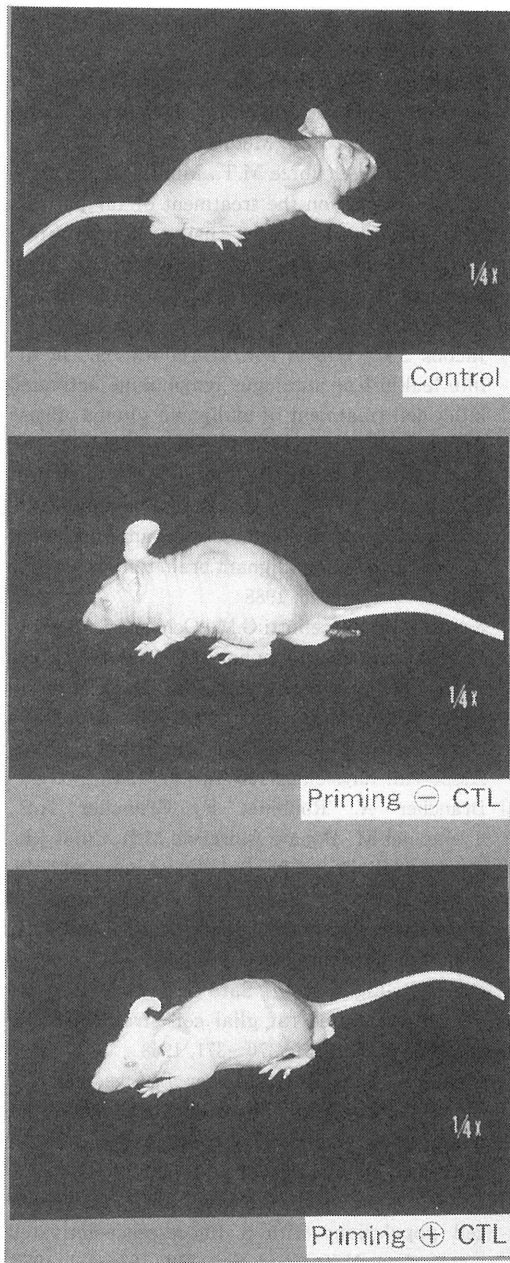


Fig. 6 キラー T 細胞の腫瘍増殖抑制効果 (*in vivo*) Control および Priming-CTL では小指頭大の腫瘍を形成しているが Priming+CTL では腫瘍形成は認めない。

性は認められなかった。この事実よりキラー活性を誘導するためには感作された細胞が *in vitro* で再度抗原刺激を受けつつ IL-2 存在下で培養されることが必要不可欠である。このキラー細胞は C6 神経膠腫細胞に対してキラー活性を示すが抗原性が異なる

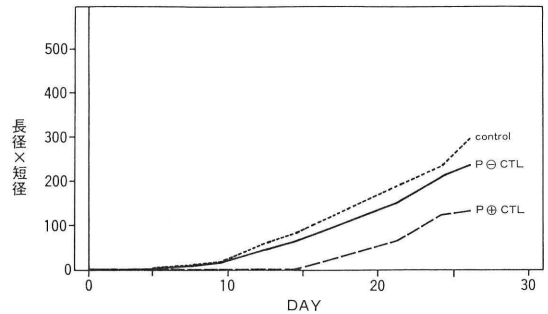


Fig. 7 キラー T 細胞の腫瘍増殖抑制効果 (*in vivo*) 腫瘍の大きさを短径と長径の積で示し経時的に観察したグラフであるが Priming+CTL では Control および Priming-CTL に比べ明らかに腫瘍増殖抑制効果を示す。

9L 神経膠腫細胞に対しては活性を示さなかった。すなわち誘導されたキラー細胞は抗原特異的であった。このキラー細胞はヌードマウスの皮下に移植された腫瘍細胞に対しても増殖抑制効果を示した。

キラー活性をもつ細胞群では非活性群に比べて CD3, CD8 陽性細胞が有意に増加していたことから CD8 陽性キラー T 細胞が誘導されたものと推測された。この結果は Reinhertz ら²¹⁾の報告と一致した。CD8 陽性キラー T 細胞の分化には CD4 陽性ヘルパー T 細胞亜集団 (Th 1) の関与が必要である。Th 1 細胞は IL-2, γ -インターフェロン等を分泌し、キラー T 前駆細胞の分化に関わっている²²⁾。本実験結果でも十分なキラー活性を得るためには *in vivo* の感作と *in vitro* での抗原及び IL-2 刺激が必要と思われた。この事実はキラー T 細胞の誘導には *in vivo* の感作、あるいは IL-2 以外のサイトカインが必要であることを示唆している。最近、マクロファージあるいは B 細胞から分泌される IL-12 がキラー T 細胞の分化、増殖に重要であると報告されており^{23)~25)}, *in vivo* 感作の役割は興味深い。

3. CTL の細胞障害性及びその投与方法

in vitro で誘導されたキラー T 細胞はヌードマウスに移植された腫瘍の増殖を抑制した。しかし腫瘍移植後 25 日目に観察するとコントロールに比べて小さいが、腫瘍形成が認められた。実験上、キラー T 細胞は単回投与のみであるが、更には複数回の手段も考慮すべきであろう。本研究では単にキラー T 細胞の数が不十分であった可能性も否定できなかった。同時にキラー T 細胞に抵抗性の腫瘍細胞が残存し、その細胞が増殖してきた可能性もあった。すな

わち本研究ではキラー T 細胞による免疫療法は腫瘍細胞を抑制したが、完全に阻止することは不可能であった。この傾向は諸家の報告でも散見された^{5)~8)}。

キラー T 細胞のヒトへの応用を検討する際には投与方法も重要な問題となる。前述したごとく LAK 細胞の全身投与では大部分の細胞は肺、肝臓、脾臓に集積するため、目的とする脳腫瘍に到達する細胞数に限界が生じた。生理学的に、血液脳関門の存在がこの問題を更に困難にした。一方、この問題を回避するために局所投与を行ったところ、投与後早期より投与腔表面に肉芽組織が形成された。この組織がキラー T 細胞の腫瘍組織深部への到達の障害となった。従って本法での有効な手段は十分にキラー活性を有する細胞を投与することにある。このことから抗原特異性を持ち、高いキラー活性を持つキラー T 細胞は悪性神経膠腫に対する有効な治療手段となり得るものと期待された。

結 語

1. ラット神経膠腫細胞 (C6) に特異的な CD8 陽性キラー T 細胞の誘導を行うことに成功した。

2. キラー T 細胞の誘導には *in vivo* での感作と、*in vitro* での二次刺激が必要であった。

3. 本法は臨床上、悪性神経膠腫に対する有効な治療手段となり得るものと思われた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました伊東洋教授並びに水口純一郎教授に深甚の謝意を表します。ご協力いただいた脳神経外科学および免疫学教室各員に感謝いたします。

本論文の要旨は第 52 回日本脳神経外科学会総会に於て発表した。本研究の一部は平成 4 年度東京医科大学研究助成金によった。

参 考 文 献

- 1) Levin V.A., : Pharmacological principles of brain therapy "Neoplasia in the Central Nervous System" ed by Thompson R.A., 1976, 315~325, Raven Press, New York
- 2) 浅井昭雄, 他: 脳腫瘍放射線治療後の亜急性障害としての脳萎縮と痴呆. 癌の臨床 **35**: 753~761, 1987
- 3) 吉田達生, 生塩之敬, 最上平太郎, 他: グリオーマにおける抗癌剤耐性のメカニズムとその克服. 癌と化学療法 **13**: 2751~2757, 1984
- 4) 会田敏光, William B.J., : ヒト脳腫瘍細胞における

ACNU 耐性機構の研究. Neurol. Med. Chir. (Tokyo) **27**: 825~830, 1987

- 5) Rosenberg S.A., : Immunotherapy of cancer by systemic administration of lymphoid cells plus interleukin-2. J. Biol. Modif. **3**: 501~511, 1985
- 6) Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M., et al: A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. N. Engl J. Med. **316**: 889~897, 1987
- 7) Jacobs S.K., Wilson D.J., Kornblith P.L., et al: Interleukin-2 or autologous lymphokine activated killer cell treatment of malignant glioma: Phase I trial. Cancer Res. **46**: 2101~2114, 1986
- 8) Yoshida S., Tanaka R., Takai N., et al: Local administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 to patients with malignant brain tumors. Cancer Res. **48**: 5011~5016, 1988
- 9) Kotasek D., Vercellotti G.M., Ochoa C.C., Bach F. H., Jacob H.S., : Lymphokine activated killer (LAK) cell-mediated endothelial injury: a mechanism for capillary leak syndrome in patients treated with LAK cells and interleukin-2. Trans Assoc Am Physicians **100**: 21~27, 1987
- 10) Brancher A., Roubinet F., Grancher A.S., Tremoulet M., Bonate A, Delisle M.B., Calot J.P., Pourreau C., Ducos J., et al: Local immunotherapy of recurrent glioblastoma multiforme by intracerebral perfusion of interleukin-2 and LAK cells. Eur Cytokine Netw **4**(5): 331~341, 1993
- 11) Benda P., Lightbody J., Sato G., Levine L., Sweet W.: Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. Science **161**: 370~371, 1968
- 12) Benda P., Someda K., Messer J., Sweet W.H., : Morphological and immunochemical studies of glial tumor and clonal strains propagated in culture. J. Neurosurg **34**: 310~323, 1971
- 13) Loken, M.A., and Herzenberg, L.A.: Analysis of cell populations with a fluorescence-activated sorter. Ann. N.Y. Acad. Sci., **254**: 163~171, 1975
- 14) Lotze, M.T., Line, B.R., Mathisen, D.J., et al.: 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. Immuno **125**(4): 1487~1493, 1980
- 15) 中村博彦, 設楽信行, 和田照美, 高倉公朋: 悪性腫瘍に対する養子免疫療法の基礎と臨床応用: LAK 細胞の誘導と治療上の問題点. BIOTHERAPY **3**(1): 175~178, 1989

- 16) 新田泰三, 石沢 敦, 伊藤昌徳・他: Bispecific Antibody を用いた悪性グリオーマの治療 神経免疫研究 **2**: 249~253, 1989
- 17) Frodin J.E., Lefvert A.K., Mellstedt H.: The clinical significance of HAMA in patients treated with mouse monoclonal antibodies. *Cell Biophys* **21**(1-3): 153~165, 1992
- 18) Blottiere H.M., Douillard J.Y., Koprowski H., Steplewski Z.: Immunoglobuline class and immunoglobuline G subclass analysis of human anti-mouse antibody response during monoclonal antibody treatment of cancer patients. *Cancer Res.* **50**: 1051~1054, 1990
- 19) 藤本重義: 特異的免疫療法としての CTL 療法 *Medical Immunology* **19**: 25~30, 1990
- 20) 北原聡樹: 活性化リンパ球を用いた脳腫瘍の治療 ~Interleukin 2 依存性腫瘍特異的キラー T 細胞を用いて~ *順天堂医学* **32**(3): 282~291, 1986
- 21) Reinhertz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., et al.: Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4061~4065, 1987
- 22) Mosmann, T.R. & Coffman, R.L.: Th 1 and Th 2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.*, **7**: 145~173, 1989
- 23) Gately, M., Desai, B.B., Wolitzky, A.G., et al.: Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-2 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J. Immunol.*, **147**: 874~882, 1991
- 24) D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N.M., et al.: Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.*, **176**: 1387~1398, 1992
- 25) Yoshida, A., Koide, Y., Uchijima, M., et al.: INF- γ induces IL-12 mRNA expression by a macrophage cell line. *J. 774. BBRC*, **198**: 857~861, 1994

Generation of Cytotoxic T Lymphocytes (CTLs) Specific for Rat Glioma Cells

Kimio SAITO

Department of Neurosurgery, Tokyo Medical College
(Director : Prof. Hiroshi ITO)

Lymphokine activated killer (LAK) therapy has become one of the common adjuvant therapies for malignant glioma. However, since LAK cells do not have specificity for antigens, one of the most important problems of this method is the difficulty in obtaining sufficient cytotoxicity against tumors. On the other hand, cytotoxic T lymphocytes (CTLs) have antigen specificity, but at present there is no established method to generate them. In this study, we tried to generate CTLs specific for rat glioma cells, using Wistar rats and their glioma cells (C6-glioma). Killer cells against rat glioma cells were only generated by immunization with irradiated C6 glioma cells intraperitoneally (*in vivo* priming), followed by challenge with the same C6 glioma cells in the presence of Interleukin-2 (secondary stimulation). They were not generated by only *in vivo* priming or secondary stimulation. The killer cells were shown to have remarkable cytotoxic activity against C6 cells by ^{51}Cr -releasing assay but not against 9 L glioma cells which are allogenic glioma cells. T-cell subset depletion test revealed that the major surface phenotype of these killer cells was CD3-positive, CD4-negative, and CD8-positive. These results suggest that the killer cells generated were CD8⁺, C6 glioma-specific CTLs.

〈Key words〉 Malignant glioma, Immunotherapy, Cytotoxic T lymphocyte.
