

マウス自然発生癌の腫瘍内浸潤リンパ球に関する研究

高橋 衛

岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任：関山三郎教授)

A Study on Tumor Infiltrating Lymphocytes
in Mice with Spontaneous Carcinoma.

Mamoru Takahashi

Second Department of Oral and Maxillofacial
Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical
University.

①

マウス自然発生癌の腫瘍内浸潤リンパ球に関する研究

高橋 衛

岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任：関山三郎教授)

A Study on Tumor Infiltrating Lymphocytes
in Mice with Spontaneous Carcinoma.

Mamoru Takahashi

(Second Department of Oral and Maxillo-
facial Surgery, School of Dentistry, Iwate
Medical University, Morioka 020)

岩手県盛岡市中央通1-3-27(020)

Abstract : Differences in the immune responses between immunized and non-immunized mice placing special emphasis on tumor infiltrating lymphocytes (TIL) were studied using inbred WHT/Ht mice with spontaneous developing transplantable squamous cell carcinoma. After inoculating 1×10^6 tumor cells, in both immunized and non-immunized mice a lymphocyte proliferation response was observed in the spleen and adjacent lymph nodes. In a histological study it was found that there was a marked infiltration of lymphoid cells into the tumor tissues of immunized mice, but this was much less in the non-immunized mice. The results of lymphocyte subset analysis by fluorescent antibody method and FACScan indicated that almost all of the TIL in the immunized mice consisted surface-Ig⁺, Mac-1⁺ and asialoGM1⁺ cells showing almost total agreement with the distribution of spleen cells, but the distribution in the

non-immunized mice showed that Lyt-1⁺ and L3T4⁺ cells were dominant differing from those of the spleen cells. Furthermore, killer activity of these TIL and spleen cells against syngeneic tumor cells was studied by ⁵¹Cr release assay. These results show that in the TIL and spleen cells of the immunized mice cytolytic activity, natural killer activity, and ADCC activity were observed, but neither of these could not be detected in the non-immunized mice.

Given the above, it was suggested that the infiltration of TIL is an expression of the immune response of the tumor-bearing host against tumor-rejection antigens, and in the tumor location of immunized mice various effector cells with anti-tumor activity were acting for tumor rejection.

抄録：近交系 WHT/Ht マウス由来自然発生扁平上皮癌の免疫，および非免疫マウスの免疫応答の差異を腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) に着目し，比較検討した。1 × 10⁶ 個の腫瘍移植後，免疫，非免疫マウスとも，脾臓ならびに所属リンパ節のリンパ球増殖反応を認めた。組織学的検索において，免疫マウスの腫瘍組織内には著しいリンパ系細胞の浸潤を認めたが，非免疫マウスでは少なかった。リンパ球 subset 分析を蛍光抗体法ならびに FACScan を用いて行った結果，免疫マウスの TIL は，surface-Ig⁺，Mac-1⁺，asialo GM1⁺ 細胞がほとんどを占め，脾細胞の subset の分布と一致していたが，非免疫マウスの TIL では Lyt-1⁺，L3T4⁺ 細胞が優位であり，脾細胞のそれとは異なっていた。さらに，TIL，脾細胞の自己腫瘍細胞に対する killer 活性を ⁵¹Cr release assay で測定した。その結果，免疫マウスの TIL および脾細胞には，細胞傷害活性，NK 活性ならびに ADCC 活性が認められたが，非免疫マウスではいずれも検出できなかった。

以上のことから，TIL の浸潤は腫瘍拒絶抗原に対する担癌宿主の免疫応答の現れであり，免

疫マウスの腫瘍移植局所では、抗腫瘍活性を有する種々の effector 細胞が腫瘍拒絶に働いていることが示唆された。

key words: tumor infiltrating lymphocytes,
immune response, immunized mouse,
spontaneous carcinoma.

ヒト癌組織内部および周囲にリンパ球浸潤が認められることが古くから知られており¹⁻³⁾、その腫瘍内浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocytes, 以下TILと略す)の浸潤程度と癌の進展度、リンパ節転移、および患者の予後とは多くの場合有意に相関することが報告されている²⁻⁶⁾。さらに、その著しいキラー活性が*in vitro*で証明されたことから、TILを用いた養子免疫療法が新しい免疫療法として注目されており、臨床においてもかなりの効果が得られている⁷⁻⁹⁾。

これらのことからTILの浸潤は、腫瘍に対する生体の免疫応答の反映であり、それは腫瘍細胞増殖局所において最も直接的に現れると考えられる。従来^{9,10)}の知見では、ヒト癌組織におけるTILは多様であり、発生する癌細胞側の要因が宿主側の応答するリンパ球のphenotype、機能発現、特異性などを規定していると考えられているが、その詳細は明らかでない。したがって、TILについて検索することは、宿主の抗腫

瘍性のメカニズムを解明し、ひいては癌免疫療法
法の発展につながるものと考えられる。また、
TILに関する動物腫瘍系の研究は、高抗原性の
誘発癌を用いて展開されてきた^{7, 11)}が、ヒト
癌と同様に低抗原性とされている動物の自然発
生癌を使用した報告はほとんどない^{12, 13)}。

そこで本研究では、近交系WHT/Htマウスに自
然発生した扁平上皮癌を用い、免疫、および非
免疫マウスのTILを分離し、その性状ならびに
機能について解析し、自己腫瘍に対する生体の
免疫応答の差異を検討したので報告する。

材料および方法

1. マウス

当教室で兄妹交配により、近交系として維持
しているWHT/Htマウス¹⁴⁾(H-2K^a, H-2D不明)¹⁵⁾
の8~12週齢、雌、体重25~27gのものを使用し、
固形飼料(オリエンタル酵母工業)と水を自由に
与え飼育した。

2. 腫瘍

近交系WHT/Htマウスに自然発生し、胸部皮下

に継代移植している扁平上皮癌を使用した。この腫瘍は、 TD_{50} 値が 14.4×10^6 と極めて低免疫原性の腫瘍である。

3. 腫瘍細胞浮遊液の調整

近交系 WHT/Ht マウスに継代移植している腫瘍を、マウスから無菌的に摘出し、ダルベッコ PBS (ニッスイ、以下 PBS と略す) で洗浄後、剪刀で細切し、#150 白金メッシュで濾過した。これに 0.25% trypsin (DIFCO, U.S.A.) を加え攪拌し、細胞浮遊液とした後、PBS で 1200 rpm, 3 回遠心洗浄し、PBS に再浮遊して使用した。生細胞数の算定は 0.2% トリパンブルー染色を行ない、細胞の viability は各ロットとも 90% 以上であった。

4. 免疫マウスの作製

マウスの免疫方法は、Ibayashi らの方法¹⁷⁾に準じ、外科的切除法と mitomycin C 処理腫瘍細胞の反復接種により行なった。 1×10^6 個の腫瘍細胞を背部皮内に移植し、7~10 日後、腫瘍径が約 10 mm に達した時点で外科的に腫瘍を切除した。その 7 日後より 1 週間おきに、 1×10^6 個/ml あたり 25 μ g の mitomycin C (和光純薬) で 37°C, 1 時間処理した腫瘍細胞の 1×10^6 個を、マウス

皮内に接種する操作を6回繰り返した。最終免疫の4日後に、 1×10^6 個の腫瘍細胞を再接種し、腫瘍を拒絶したマウスを免疫マウス (immunized mice, 以下I群と略す) とし、実験に供した。また、免疫操作を加えないものを非免疫マウス (non-immunized mice, 以下N群と略す) とし、実験は、I群とN群の2群にて行なった。

5. 担癌マウスの経日的観察

担癌マウスについては、腫瘍移植局所の組織学的検索、脾臓の重量測定、および腋下リンパ節の大きさの経日的変化の観察をI群とN群マウスにおいて比較検討した。マウスの左側胸部に 1×10^6 個の腫瘍細胞を移植し、移植後2日、4日、6日、8日、10日後の腫瘍移植局所の反応を、H. E.染色にて組織学的に観察した。

同時に、脾臓の重量を測定し、以下の式で spleen index¹⁸⁾ を求めた。

$$\text{Spleen index} = \text{脾重量 (mg)} / \text{体重 (g)}$$

さらに、腫瘍移植側腋下リンパ節の縦径と横径をノギスで測定し、その平均値をリンパ節の大きさとした。対照群として、右側胸部にPBS 0.1mlを接種し、同様にリンパ節の大きさを測

定した。実験はすべて1群15匹とし、各日につき3匹を使用し、各群の平均値と標準偏差を求めた。

6. TILの免疫組織学的検索

TILの免疫組織学的検索を、蛍光抗体法¹⁹⁾で行なった。使用した抗体は、1次抗体として、マウスT細胞マーカーであるAnti-Lyt-1モノクローナル抗体(BECTON DICKINSON, U.S.A.), マウスkiller/suppressor T細胞に対応するAnti-Lyt-2モノクローナル抗体(BECTON DICKINSON, U.S.A.), マウスhelper/inducer T細胞に対応するAnti-L3T4モノクローナル抗体(BECTON DICKINSON, U.S.A.), マウスmacrophage(以下Mφと略す)に対応するAnti-Mac-1モノクローナル抗体(Boehringer Mannheim Biochemica, Germany), マウスnatural killer(以下NKと略す)細胞に対応するAnti-asialoGM1抗体(和光純薬)を用いた。2次抗体は、Anti-Lyt-1, Lyt-2, L3T4, Mac-1抗体に対して、FITC標識affinity purified anti-rat IgG(Kirkegaard & Perry Laboratories)を使用した。Anti-asialoGM1抗体に対する2次抗体はFITC標識affinity puri-

fied anti-rabbit Ig (TAGO) を使用した。また、表面免疫グロブリン surface-immunoglobulin (以下、s-Ig と略す) の検出には、FITC 標識 anti-mouse Ig (Amersham) を使用した。

免疫組織学的検索をするために、各群マウスの左側胸部に 1×10^6 個の腫瘍細胞を移植し、移植後 2 日、4 日、6 日、8 日、10 日目の腫瘍組織を切り出し試料とした。試料はアセトンードライアイスで冷却したイソペンタン中で凍結し、クリオスタットで $4 \sim 6 \mu\text{m}$ の凍結切片を作製した。これを 0.01% ポリ-L-リジン (SERVA, New York) 塗布スライドガラスに拾い、室温で 30 分間乾燥させた。アセトンで室温、10 分間固定し、0.01 M PBS (IATRON) で 5 分間、3 回洗浄後 (以後、各反応の間も同様に洗浄)、正常ヤギ血清を室温で 20 分間反応させた。次に、1 次抗体をそれぞれ適切な濃度としたものを滴下し、室温で 2 時間反応させた。続いて、2 次抗体を滴下し、室温で 2 時間反応させ、グリセリンで封入後、蛍光顕微鏡で検鏡した。

7. TIL の分離および調整²⁰⁾ (Fig. 1)

←Fig. 1

無菌的に採取した腫瘍組織を、剪刀で細切し、

#150白金メッシュで濾過した。これをPBSで1200rpm, 3回遠心洗浄後, 10% Fetal Bovine serum (FBS, GIBCO), ストレプトマイシン硫酸塩(100 μ g/l)およびペニシリンGカリウム(100単位/ml)を添加したL-グルタミン含有, RPMI 1640(GIBCO)で 1×10^6 個/mlの濃度に調整した。これの4mlを, マウスリンパ球比重分離液(M-SMF, 比重 1.090 ± 0.001 , 日本抗体研究所)3mlに静かに重層し, 1200g, 20分間遠心した。遠心後, 中間層のリンパ球分画を回収し, RPMI 1640で1200rpm, 3回遠心洗浄後, RPMI 1640に再浮遊させた。0.2%トリパンブルー染色でviabilityを確認後, 調整し実験に供した。

8. 脾細胞浮遊液の作製

エーテル麻酔で屠殺したマウスより, 無菌的に脾臓を摘出した。これを, RPMI 1640を入れたプラスチックシャーレ(Falcon)上で, 注射針とピンセットを用いてほぐした。#150白金メッシュで濾過し, PBSで洗浄後, RPMI 1640に再浮遊させた。これより, 前述のM-SMFを用いた比重遠心法でリンパ球分画を分離し, 実験に供した。

9. リンパ球 subset 分析²¹⁾

各群マウスの腫瘍移植後6日目の腫瘍組織から得たTIL, および脾細胞のリンパ球 subset 分析を, FACScan(BECTON DICKINSON)で行なった。対照群としては正常マウスの脾細胞を用いた。各細胞浮遊液 1×10^6 個/testに, 各種モノクローナル抗体 (Anti-Lyt-1抗体, Anti-Lyt-2抗体, Anti-L3T4抗体, Anti-Mac-1抗体, Anti-asialo GM1抗体) を添加し, 氷上で30分反応させた。0.1% Bovine Serum Albumin (BSA, STRATAGENE), 0.1% NaN_3 (和光純薬) 添加PBSで2回洗浄後, 2次抗体として, FITC標識 anti-rat IgG, FITC標識 anti-rabbit IgGを添加し, 氷上で30分, 暗所にて反応させた。0.1% BSA, 0.1% NaN_3 添加PBSで2回洗浄後, 0.5mlに懸濁し, 氷上で遮光し2時間以内に解析した。

10. 細胞傷害活性の測定²²⁾

各群マウスのTIL, 脾細胞の自己腫瘍細胞, およびNK細胞感受性YAC-1細胞²³⁾に対する細胞傷害活性を, ^{51}Cr release assayで測定した。

1) 腫瘍細胞の ^{51}Cr 標識

自己腫瘍細胞, YAC-1細胞をそれぞれ10%FBS,

炭酸水素ナトリウム (1mg/ml), L-グルタミン (300 μ g/ml, 和光純薬) 添加 EAGLE'S MEM (ニッスイ, 以下 MEM と略す) で 1×10^6 個/ml の濃度に調整し, 細胞 1×10^6 個あたり 3.7 MBq の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (日本アイソトープ協会) を加え, 37°C , 5% CO_2 下で時々振盪させながら 60 分間培養し標識した。反応後, MEM で 3 回遠心洗浄後, 20 ml の MEM を加え 37°C , 5% CO_2 下で 2 時間前培養を行なった。MEM で 3 回遠心洗浄後, 1×10^5 個/ml の濃度に再浮遊させた。

2) ^{51}Cr release assay

Effector 細胞として, 各群マウスの TIL, 脾細胞, 正常マウスの脾細胞を, E/T 比が 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1 となるように 96-well round-bottomed microtiter plate (Falcon, U.S.A) に 100 μ l ずつ分注した。次に, target 細胞として ^{51}Cr で標識した腫瘍細胞を 1×10^4 個/100 μ l ずつ各 well に分注し, 総量 200 μ l/well とした。対照群として, effector 細胞の代わりに MEM を 100 μ l 加えたものを自然遊離とし, 0.2% Triton X (半井化学薬品) 100 μ l を加えたものを最大遊離とした。 37°C , 5% CO_2 下で 12 時間培

養後，上清を Titer tek 上清採取システム (Skatron, Norway) により採取し， γ -カウンター (ARC-351, Aloka) で放射活性を測定した。実験はすべて triplicate で行ない，細胞傷害活性は以下の式で求めた。

細胞傷害活性 (%) =

$$\frac{\text{実験群遊離 cpm} - \text{自然遊離 cpm}}{\text{最大遊離 cpm} - \text{自然遊離 cpm}} \times 100$$

11. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 活性の測定²⁴⁾

各群マウスの TIL，脾細胞の自己腫瘍細胞に対する ADCC 活性を前述の ^{51}Cr release assay で測定した。Target 細胞として， ^{51}Cr 標識自己腫瘍細胞を 1×10^4 個 / $100 \mu\text{l}$ ，effector 細胞として，各群 TIL，脾細胞を，E:T 比が 100:1 となるように，96-well round-bottomed microtiter plate の各 well に分注した。次に，各群マウスより採取し， 56°C ，30 分で非働化した血清を，最終濃度が 1/5，1/20，1/80，1/320 となるように各 well に加えた。対照群は，血清を加えず， ^{51}Cr 標識腫瘍細胞に effector 細胞のみを加えたものとした。 37°C ，5% CO_2 下で 6 時間培養後，

Titertek上清採取システムで上清を採取し、
γ-カウンターで放射活性を測定した。実験は
すべて triplicateで行ない、ADCC活性は以下の
式で求めた。

$$\text{ADCC活性(\%)} = \{ (\text{実験群 cpm} / \text{対照群 cpm}) - 1 \} \\ \times 100$$

実験結果

1. 腫瘍移植局所の組織学的所見

腫瘍は、低分化型扁平上皮癌であった (Fig. 2 ← Fig. 2)。I群では、腫瘍移植後2日目には、顆粒球を主体とする炎症性細胞浸潤が認められた。4日目から6日目に、腫瘍組織周辺部から腫瘍組織全体に著明な単核球浸潤が認められ、経時的にその数が増加していった。同時に、腫瘍細胞の変性破壊が認められ、8日目から10日目には、腫瘍細胞は消失し、壊死組織および瘢痕組織が認められた。N群では、2日目にはI群と同様に炎症性細胞浸潤を認め、4日目から6日目には、腫瘍細胞の増殖と、その周囲に好中球ならびに単核球の浸潤が認められた。10日目には、腫瘍

の活発な増殖と，一方では腫瘍組織の自壊も認められ，自壊した部位では炎症性細胞浸潤が認められた (Fig. 3)。

← Fig. 3

2. Spleen index

脾臓の重量を測定し spleen index を求めたところ，各群とも腫瘍移植後4日目まで徐々に増加し続けた。I群では，4日目から6日目にかけて急激に増加し，6日目に 11.1 ± 1.5 と最大になり，以後腫瘍の縮小にともない減少した。N群では，6日目に 5.4 ± 0.3 ，8日目に 7.1 ± 0.1 と腫瘍の増殖にともない緩慢に増加し続けた (Fig. ← Fig. 4 4)。

3. 所属リンパ節腫脹の経日的変化

I群の腋下リンパ節は，腫瘍移植後1日目から腫大し始め，6日目にその大きさが $4.4 \pm 0.1 \text{ mm}$ と最大になり，その後，腫瘍の縮小にともない腫脹は減少した。一方，N群では2日目から腫脹が認められ，以後も徐々に増加し続けた (Fig. ← Fig. 5 5)。

4. 免疫組織学的所見

I群ではN群と比較して，腫瘍組織内に多くのリンパ球浸潤が認められた。腫瘍移植後2日目

には Mac-1⁺, asialo GM1⁺細胞の浸潤が認められた。4日目から6日目にかけて Mac-1⁺, s-Ig⁺, asialo GM1⁺細胞の浸潤が著明となった。Lyt-1⁺, Lyt-2⁺, L3T4⁺細胞の浸潤は軽度であり, 以後も浸潤程度に顕著な差は認められなかった。

Fig. 6は, 腫瘍移植後6日目の腫瘍組織の染色像 ← Fig. 6
を示すが, Mac-1⁺, s-Ig⁺, asialo GM1⁺細胞の浸潤が著明であり, Lyt-1⁺, Lyt-2⁺, L3T4⁺細胞は軽度であった。

N群では, 腫瘍内に浸潤してきているリンパ球は少なかったが, I群と同様, 腫瘍移植後2日目より認められるようになった。4日目から6日目にかけて Lyt-1⁺, Lyt-2⁺, L3T4⁺細胞の浸潤が認められたが, それ以後の各時期で浸潤程度に顕著な差は認められなかった。Fig. 7は腫瘍 ← Fig. 7
移植後6日目の腫瘍組織の染色像を示すが, Lyt-1⁺, L3T4⁺, Lyt-2⁺細胞が多く, それに対して Mac-1⁺, asialo GM1⁺細胞は少なかった。

5. リンパ球 subset 分析

FACScanによるリンパ球 subset 分析の結果を Fig. 8に示した。I群 TILの subsetは, s-Ig⁺細胞 ← Fig. 8
が37%, Mac-1⁺細胞が29%, asialo GM1⁺細胞が

24%と、これらの占める割合が多かったが Lyt-1⁺細胞は11%と少なく、L3T4⁺細胞は6%、Lyt-2⁺細胞は5%であった。N群 TILの subsetは、Lyt-1⁺細胞が66%と多く、L3T4⁺細胞は46%、Lyt-2⁺細胞は19%だった。s-Ig⁺細胞は25%、Mac-1⁺細胞は11%、asialo GM1⁺細胞は9%だった。I群 TILの Mac-1⁺、asialo GM1⁺細胞の占める割合が、N群のそれらに比較して約3倍も多かった。また、N群 TILの Lyt-1⁺細胞の占める割合は、I群のそれらに比較して約6倍多かった。

I群脾細胞は、Lyt-1⁺細胞が14%、L3T4⁺細胞が10%、Lyt-2⁺細胞が4%であり、Mac-1⁺細胞が52%、s-Ig⁺細胞が44%、asialo GM1⁺細胞が15%であった。N群脾細胞ではLyt-1⁺細胞が35%、L3T4⁺細胞が27%、Lyt-2⁺細胞が10%であり、s-Ig⁺細胞が45%、Mac-1⁺細胞が18%、asialo GM1⁺細胞が6%であった。正常マウスの脾細胞の subsetは、Lyt-1⁺細胞が54%であり、そのうちL3T4⁺細胞が35%、Lyt-2⁺細胞が15%であった。また、s-Ig⁺細胞が36%、asialo GM1⁺細胞が9%、Mac-1⁺細胞が6%であった。これら3群を比較すると、I群脾細胞は、N群脾細胞、あるいは正常

マウス脾細胞に比較して，Mac-1⁺細胞が多く，Lyt-1⁺，Lyt-2⁺，L3T4⁺細胞が少なかった。また，asialo GM1⁺細胞は軽度に増加したが，s-Ig⁺細胞の割合はほぼ同じであった。N群脾細胞では正常マウス脾細胞に比較して，Mac-1⁺，s-Ig⁺細胞の割合が多く，Lyt-1⁺，Lyt-2⁺，L3T4⁺細胞の割合が少なかった。

TILの採取量は，N群が 5.5×10^5 個/gであったのに対し，I群では 6.3×10^6 個/gとN群の11.5倍であった。

6. 細胞傷害活性

各実験群のTILおよび脾細胞の自己腫瘍細胞に対する細胞傷害活性，ならびにYAC-1細胞に対するNK活性を，E:T比が100:1，50:1，25:1，12.5:1，12時間培養で実験を行なった結果をTable 1，Fig. 9に示した。

← Table 1
Fig. 9

I群TILの細胞傷害活性は，E:T比が100:1で18.7%と最大値を示した。I群脾細胞の細胞傷害活性は，E:T比が100:1で15.3%であった。

N群TIL，脾細胞および正常マウス脾細胞には，自己腫瘍細胞に対する細胞傷害活性は認められなかった。

I群 TILの NK活性は， E:T比が 100:1で 10.7%と最大値を示し， I群脾細胞では， E:T比が 100:1で 7.3%であった。 N群脾細胞の NK活性は， E:T比が 100:1で 3.6%と軽度に認められた。

N群 TILおよび正常マウス脾細胞では NK活性は認められなかった。

7. ADCC活性

E:T比 100:1に， 血清濃度が 1/5， 1/20， 1/80， 1/320， 6時間培養で実験を行なったところ， I群 TILの ADCC活性は， 血清濃度が 1/5で 7.7%， 1/20で 7.3%であった。 I群脾細胞の ADCC活性は， 1/5で 20.9%， 1/20で 21.1%と最大値を示した。

N群 TILおよび脾細胞では ADCC活性は認められなかった。(Table 2, Fig.10)。

← Table 2
Fig.10

考 察

TILの浸潤は， 組織学的に悪性腫瘍に認められる特徴の一つである。 Handley¹⁾によって最初に報告されて以来， TILの浸潤程度と， 臨床病態および患者の予後との関連についての解析がなされ， TILは担癌宿主の抗腫瘍免疫反応で

あることが示唆されてきた^{2~6)}。Itoら⁹⁾の報告では、転移性メラノーマより分離したTILは、CD3⁺、Class I拘束性で、著しい自己腫瘍特異的cytotoxic T lymphocyte(CTL)活性を示すが、肉腫、腎細胞癌より採取したTILでは、CTL活性は低く、末梢血と同様の生物活性を有しているにすぎないとしている。このように、腫瘍に対する宿主の免疫応答は広いスペクトルを持った反応であり、それは腫瘍局所において最も直接的に現れると考えられる。したがって、自己腫瘍に対する免疫応答に関与するTILについて、その性状、機能を解析し検討することは極めて有用である。

近交系WHT/Htマウスに自然発生した扁平上皮癌は、Hewittら¹⁶⁾により極めて低抗原性であることが指摘され、免疫応答の弱いヒト癌のモデルに当てはめられる。一方、この動物腫瘍系においては、弱いながらも腫瘍関連抗原が存在することや、これに特異的な免疫応答が成立することが明らかにされている^{25~29)}。

そこで今回、著者は、免疫マウスと非免疫マウスに腫瘍を移植し、そのTILを分離し、性状

ならびに機能について解析するとともに，自己腫瘍に対する生体の免疫応答の差異を検討した。

TILの分離方法は，一般的に広く用いられている比重遠心法²⁰⁾で行なった。本法は，比較的簡単な操作で，リンパ球画分構成に影響を与えず，効率よく高い回収率でTILを分離できる有用な方法である。しかし，数%の腫瘍細胞の混入は避けることができず，また，遠心操作により細胞への影響を及ぼすこともあるなどの問題点があげられるが，本実験では，腫瘍細胞の混入率は6%以下であり，リンパ球のviabilityは90%以上と，比較的实验への影響は少なかった。

リンパ球表面マーカーの解析は，モノクローナル抗体を使用した免疫組織学的検索で行った。この方法は，組織切片上におけるリンパ球subsetの動態を知る上で優れている方法であるが，リンパ球は組織内で不均一に分布しているため，客観性に欠けるという問題点も指摘されている。この点FACSscanを用いた方法は²¹⁾，解析対象の細胞群を同定する際の客観性にすぐれ，かつ迅速に解析することができるばかりでなく，応用

範囲が広く，有用性が極めて高い方法である。本実験では，より信頼性の高い結果が得られるように，免疫組織学的検索とFACSscanを併用した。

腫瘍移植後の宿主の全身の免疫応答として脾重量の測定を，また，局所の免疫応答として所属リンパ節の腫大を測定した。その結果I群はN群に比較して，脾臓，およびリンパ節は腫瘍の消長と平行して鋭敏に変化したが，N群では，腫瘍移植後の初期の脾臓および，所属リンパ節反応が緩慢であり，腫瘍の増殖とともに継続的な腫大を認めた。このように，脾臓，およびリンパ節は全身と局所の腫瘍に対する反応を如実に反映するものと思われた。特にI群マウスは頻回の免疫操作により自己腫瘍細胞に感作され，N群マウスとは異なり，抗腫瘍活性を担う免疫担当細胞が生体内で蓄積され，抗原の再刺激に対していち早く対応できる状態にあることを表わしている。

リンパ球subset分析は，腫瘍移植後6日目に行ったが，これは，I群マウスにおいて腫瘍移植後の宿主の経日的変化がピークとなる時期で

あった (Fig. 3, 4, 5)。その結果, I群 TILは, s-Ig⁺, Mac-1⁺, asialoGM1⁺細胞の浸潤が著明に認められ, Lyt-1⁺細胞は少なかった。N群では, Lyt-1⁺, L3T4⁺細胞が優位であり, Mac-1⁺, asialoGM1⁺細胞は少なかった。このようなI群とN群のTIL subsetの差は, 腫瘍移植局所での腫瘍細胞に対する免疫応答が大きく異なることを示し, I群 TILは, 腫瘍拒絶を initiate または mediate する機能を有するリンパ球であり, N群 TILは, このような機能を持たないか, あるいは抑制されており, 腫瘍の増殖を許容してしまうリンパ球と推測される。さらに, I群でMφなどの特定の細胞が腫瘍局所に浸潤しているのは, chemotaxisを起す遊走因子^{11, 30-32)}や細胞接着因子³³⁻³⁶⁾の関与が考えられた。

I群脾細胞の subsetは, Mac-1⁺, s-Ig⁺細胞がほとんどを占め, Lyt-1⁺細胞は少なく, N群脾細胞では, Lyt-1⁺, L3T4⁺, s-Ig⁺細胞が多くを占め, Mac-1⁺, asialoGM1⁺細胞は少なかった。また, I群とN群の脾細胞の subsetは, 対照群のそれと比較して異なっており, I群において顕著であった。さらに, I群のTILと脾細胞の sub-

subsetの分布はほぼ一致していたが、N群では異なっていた。このことは、I群とN群では、腫瘍に対する宿主の全身の免疫応答が異なっており、I群では、全身の免疫応答が局所に反映されているが、N群では反映されていないことが示唆された。

TILおよび脾細胞の自己腫瘍細胞に対する細胞傷害活性について検討したところ、I群TILは強い細胞傷害活性を示したが、N群TILでは示さなかった。また、I群脾細胞は細胞傷害活性を示したが、TILに比較して低く、N群脾細胞および対照群では示さなかった。このように、I群とN群でTILの細胞傷害活性が異なるのは、TILのsubsetの分布の差、ならびにTILの自己腫瘍細胞に対する免疫寛容性の差によるためと思われる。また、I群脾細胞と、N群脾細胞および対照群とで細胞傷害活性が異なるのは、TILの場合と同様に、脾細胞のsubsetの分布の差、ならびに脾細胞の自己腫瘍細胞に対する免疫寛容性の差が考えられた。さらに、N群脾細胞と対照群とではsubsetの分布が異なるのに、両者とも活性が認められないのは、生体内のリンパ球が

腫瘍に感作されておらず，腫瘍を認識し傷害することができないためと思われた。

I群において，TILと脾細胞のsubsetの分布は，ほとんど差がないにもかかわらず，TILの方が強い細胞傷害活性を示したのは，腫瘍局所におけるリンパ球の分化成熟の程度が異なるためと思われた。

TILおよび脾細胞のNK活性について検討したところ，I群TILはNK活性を示したが，N群TILでは示さなかった。また，I群脾細胞とN群脾細胞は軽度のNK活性を示したが，I群TILに比較して低く，対照群では示さなかった。このことは，I群においては，NK活性を担うasialo GM1⁺細胞の占める割合が多いためと考えられ，また，N群脾細胞においても腫瘍細胞の移植によって，わずかではあるがNK細胞が活性化されていることが推測された。

TILおよび脾細胞の自己腫瘍細胞に対するADCC活性について検討したところ，I群TILはADCC活性を示したが，N群TILでは示さなかった。I群脾細胞はI群TILの2倍以上の高いADCC活性を示したが，N群脾細胞では示さなかった。この

ことは、ADCC活性はB細胞が産生する抗腫瘍特異抗体とMφなどの細胞表面にFc receptorを有する細胞による特異的な腫瘍細胞破壊機構³⁷⁾であるので、I群には、抗腫瘍特異抗体が存在し、なおかつ、Mac-1⁺、s-Ig⁺細胞の占める割合が、N群に比較して多いためと思われた。I群脾細胞が高い活性を示したことは、ADCC活性を担うとされているMφの占める割合がTILにおけるよりも高いためと思われた。

本実験におけるTILについて総括してみると、I群マウスのTILはs-Ig⁺、Mac-1⁺、asialo GM1⁺細胞が多く、さらにこれらがeffector細胞として自己腫瘍細胞に対して、細胞傷害活性、ADCC活性、およびNK活性を示した。また、先に阿部²⁹⁾は、本実験と同じ動物腫瘍系において、非担癌状態の免疫マウス脾細胞では、anti-Thy1.1+C処理により、細胞傷害活性は91.8%抑制され、anti-Lyt2.2+C処理により細胞傷害活性が84.9%抑制されることから、抗腫瘍活性の中心はCTLであるとしている。しかし、本実験の担癌状態の免疫マウス脾細胞では、Mac-1⁺細胞が52%、s-Ig⁺細胞が44%と多く、Lyt-1⁺細胞が14%、Lyt-2⁺

細胞が4%と少なかった。このことは、非担癌状態と担癌状態の相違であるとも考えられ、腫瘍局所のTILの分布にも反映しており、極めて興味深い結果であった。腫瘍局所には、割合は少ないが、Lyt-1⁺、Lyt-2⁺細胞の浸潤が認められ、担癌状態であっても、腫瘍拒絶の一翼を担っているのではないかと推測された。

N群マウスのTILは、Lyt-1⁺、L3T4⁺細胞が多いが、抗腫瘍活性は認められなかった。その原因の大半は、腫瘍拒絶抗原 tumor rejection antigen (TRA) が存在するとしてもその免疫原性が弱く、十分な免疫応答を誘導できないことによると推測された。また、N群マウスのTILはI群と異なり、腫瘍を認識し排除する能力が弱いことや、*in vivo* primeされていても何らかの原因で活性化のシグナルが阻止されていることが考えられる。

本実験に使用した腫瘍は低抗原性であるため、細胞表面のTRAの発現は少なく、腫瘍特異的CTL、ADCCのみでは腫瘍を拒絶しきれないことが推測された。しかし、免疫マウスでは移植した腫瘍が完全に拒絶され、しかも腫瘍移植局所にはNK、

MφなどのTRAと関連なく抗腫瘍活性を示すeffector細胞の浸潤が、多く認められたことから、これらがTRAを発現していない腫瘍細胞を標的としていることが推測された。このことは、腫瘍の拒絶が、特定の細胞群だけで起きるのではなく、特異的、あるいは非特異的な種々のeffector細胞の共同作用によって、惹起されることが示唆された。濱岡は³⁸⁾、これらの抗腫瘍免疫反応は、免疫担当細胞間の相互作用によりもたらされると報告しており、本実験でも同様の機構が働いていることが推測された。

本実験においては、I群TILが脾細胞に比較して高い細胞傷害活性を示したことから、とりわけ腫瘍移植局所において抗腫瘍免疫応答が増強されており、腫瘍に対する拒絶反応は、局所に浸潤してきている免疫担当細胞間の、複雑な相加相乗作用によってもたらされたと考えられるが、その説明には今後の検討が必要と思われた。

結 論

近交系WHT/Htマウス自然発生扁平上皮癌を用

いて、免疫、および非免疫マウスのTIL、脾細胞の性状ならびに機能の検索を行ない、自己腫瘍に対する宿主の免疫応答の差異を検討した結果、以下の結論を得た。

1. I群では、腫瘍組織内に著しいリンパ球浸潤が認められ腫瘍が拒絶されるのに対し、N群では、腫瘍組織内のリンパ球浸潤に乏しく、腫瘍は増殖し続け腫瘍死した。

2. 腫瘍移植後、脾臓および所属リンパ節における免疫反応は、腫瘍拒絶の有無にかかわらず認められた。

3. 免疫組織学的検索およびFACSscanにより、I群の腫瘍組織中には、s-Ig⁺、Mac-1⁺、asialo GM1⁺細胞が多く浸潤していたが、N群では、Lyt-1⁺、L3T4⁺細胞の浸潤が優位であった。

4. TILのsubsetの分布と、脾細胞のsubsetの分布について検索したところ、I群はほぼ一致していたが、N群では異なっていた。さらにI群では、TILの浸潤が腫瘍局所に多く認められたことから、全身の免疫応答が腫瘍局所に反映されていることが示唆された。

5. TILと脾細胞の自己腫瘍細胞に対する細胞傷

害活性を測定したところ、I群において細胞傷害活性を認め、TILは脾細胞に比較して高いものであったが、N群のTIL、脾細胞には認められなかった。

6. TILと脾細胞のNK活性を測定したところ、I群のTIL、脾細胞、およびN群脾細胞において軽度に認められたが、N群のTILには認められなかった。

7. TILと脾細胞のADCC活性を測定したところ、I群においてADCC活性が認められ、TILに比較し脾細胞がより高い活性を示したが、N群のTIL、脾細胞には認められなかった。

8. 以上の結果より、腫瘍免疫が成立し腫瘍を拒絶するようになったマウスでは、腫瘍移植局所に抗腫瘍活性を持った免疫担当細胞が浸潤し、種々のeffector機構が腫瘍拒絶に働いていることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤な御指導と御校閲を賜わりました恩師関山三郎教授に深甚なる

謝意を捧げます。また終始御親切な御指導，御鞭撻をいただいた当講座深澤肇講師に衷心より感謝の意を表します。近交系 WHT/Ht マウスを提供して下さいました，東北大学医学部放射線医学講座坂本澄彦教授に深謝いたします。さらに本学口腔解剖学第二講座立花民子助教授，ならびに口腔病理学講座武田泰典講師に深謝いたします。貴重な器材の使用を御快諾頂き御懇切な御助言を賜わった本学産婦人科学講座西谷巖教授に深甚なる謝意を表します。また，本研究の遂行に際し，御助言を頂きました当講座結城勝彦助教授に深く感謝するとともに，口腔外科学第二講座医局員各位に心より謝意を表します。

本論文の要旨は1991年5月17日第45回日本口腔科学会総会において発表した。

参 考 文 献

- 1) Handley, W. S.: The pathology of melanotic growths in relation to their operative treatment. The Lancet 1:927-933, 1907.
- 2) Black, M. M., Opler, S. R. and Speer, F. D.: Microscopic structure of gastric carcinomas and their regional lymph nodes in relation to survival. S. G. O. 98:725-734, 1954.
- 3) Black, M. M., Freemann, C., Mork, T., Harvei, S. Cutler, S. J.: Prognostic significance of microscopic structure of gastric carcinomas and their regional lymph nodes. Cancer 27:703-711, 1971.
- 4) 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.
- 5) Bennett, S. H., Futrell, J. W., Roth, J. A., Hoyer, R. C. and Ketcham, A. S.: Prognostic significance of histologic host response in cancer of the larynx or hypopharynx. Can-

cer. 28:1255-1265, 1971.

6) 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.

7) Rosenberg, S. A., Spiess, P. and Lafreniere, R.: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. Science 233:1318-1321, 1986.

8) Rosenberg, S. A., Packard, B. S., Aebersold, P. M., Solomon, D., Topalian, S. L., Toy, S. T., Simon, P., Lotze, M. T., Yang, J. C., Seipp, C. A., Simpson, C., Bock, C. C. S., Schwartzentruber, D., Wei, J. P. and White, D. E.: Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. N. Engl. J. Med. 319:1676-1680, 1988.

9) Ito, K., Platsoucas, C. D. and Balch, C. M.: Autologous tumor-specific cytotoxic T

- lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. Activation by interleukin 2 and autologous tumor cells, and involvement of the T cell receptor. J. Exp. Med. 168:1419-1441, 1988.
- 10) Topalian, S. L., Solomon, D. and Rosenberg, S. A.: Tumor-specific cytotoxicity by lymphocytes infiltrating human melanomas. J. Immunol. 142:3714-3725, 1989.
- 11) Yamaki, T., Ueda, T. and Kikuchi, K.: Cellular mechanisms of tumor rejection in rats. Nat. Immun. Cell Growth Regul. 9:1-25, 1990.
- 12) Key, M. and Haskill, J. S.: Immunohistologic evidence for the role of antibody and macrophages in regression of the murine T1699 mammary adenocarcinoma. Int. J. Cancer 28:225-236, 1981.
- 13) Rios, A. M., Miller, F. R. and Heppner, G. H.: Characterization of tumor-associated lymphocytes in a series of mouse mammary tumor lines with differing biological properties. Cancer Immunol. Immunother. 15:87-

91, 1983.

14) Hewitt, H. B. and Sakamoto, K.: The comparative survival of clonogenic cells of a murine epithelioma after irradiation in mice breathing air, oxygen and carbon dioxide, or hyperbaric oxygen. Br. J. Radiol. 44: 457-463, 1971.

15) Katoh, H.: Biochemical marker profiles of inbred strains of the mouse. 実験動物特別委員会編；文部省がん特別研究(1)「がん研究に用いられる実験動物」, 柴原出版, 神戸, 155-161ページ, 1989.

16) Hewitt, H. B., Blake, E. R. and Walder, A. S.: A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of murine tumors of spontaneous origin. Br. J. Cancer. 33: 241-259, 1976.

17) 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.

- 18) Ford, W. L.: Chapter 30, Measurement of graft-versus-host activity: The spleen weight assay. Weir, D. M. ed., Handbook experimental immunology, 3rd. ed., Alden Press, Oxford. pp7, 1978.
- 19) 川生 明 : 蛍光抗体法の原理と基本技術, 川生 明 著 ; 蛍光抗体法 - その原理と技術および応用 - 第1版, ソフトサイエンス社, 東京, 2-41ページ, 1983.
- 20) 玉内 秀一 : リンパ球系細胞の分離, 日本生化学会編 ; 分子免疫学 I 免疫細胞. サイトカイン 第1版, 東京化学同人, 東京, 22-23ページ, 1989.
- 21) 松田 浩則, 八木田 秀雄 : モノクローナル抗体を用いた細胞表面マーカーの解析, 実験医学, 6:943-952, 1988.
- 22) 奥野 清隆, 水落 利明, 藤原 大美 : キラー T細胞の誘導 (in vivo sensitization) とその活性の測定 (cytotoxicity test), 日本免疫学会編 ; 免疫実験操作法 VIII 第一版, 前田印刷, 金沢, 3551-3563ページ, 1982.

- 23) Habu, S., Fukui, H., Shimamura, K., Kasai, M., Nagai, Y., Okumura, K. and Tamaoki, N.: In vivo effects of anti-asialo GM1. I. Reducton of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. J. Immunol. 127:34-38, 1981.
- 24) 小寺良尚: ADCC, 矢田純一, 藤原道夫編; 新リンパ球機能検索法 第1版, 中外医学社, 東京, 210-222, 1987.
- 25) Fukazawa, H.: Immune responses of lymphocytes to spontaneous carcinoma cells of mice. J. Iwate Med. Ass. 32:911-916, 1980.
- 26) 船木康博: マウス自然発生癌可溶化抗原に対するリンパ球の免疫応答に関する研究, 岩医大歯誌, 12:24-34, 1987.
- 27) 小野 実: マウス自然発生癌の可溶化抗原の性状に関する研究, 岩医大歯誌, 13:283-289, 1988.
- 28) 宮野敦志: マウス自然発生癌の腫瘍抗原の免疫原性に関する研究, 岩医大歯誌, 14:6-16, 1989.
- 29) 阿部美智夫: 特異的, 非特異的免疫賦活時

におけるマウス自然発生癌の免疫応答, 岩医
大歯誌, 16:15-24, 1991.

30) Ziff, M.: Role of Endothelium in chronic
inflammation. Springer Semin. Immunopathol.
11:199-214, 1989.

31) Honda, M. and Hayashi, H.: Characterization
of three macrophage chemotactic factors
from PPD-induced delayed hypersensitivity
reaction sites in guinea pigs, with spe-
cial reference to a chemotactic lympho-
kine. Am. J. Pathol. 108:171-183, 1982.

32) Kambara, T., Kawaguchi, T., Yamamoto, T. and
Kukita, I.: Chemotactic factors for macro-
phages induced in vivo. Macrophage Biology
, Liss, New York, Vol 4:271-284, 1985.

33) Pals, S. T., Horst, E., Scheper, R. J. and
Meijer, C. J. L. M.: Mechanisms of human lym-
phocyte migration and their role in the
pathogenesis of disease. Immunol. Rev. 108:
111-133, 1989.

34) Tomita, Y., Nishiyama, T., Watanabe, H.,
Fujiwara, M. and Sato, S.: Expression of in-

- tercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)
on renal-cell cancer: Possible significance
in host immune responses. Int. J. Cancer
46:1001-1006, 1990.
- 35) Ellices, M. J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse,
C., Luhowskyj, S., Hemler, M. E. and Lobb, R. R.:
VCAM-1 on activated endothelium interacts
with the leukocyte integrin VLA-4 at a
site distinct from the VLA-4/fibronectin
binding site. Cell 60:577-584, 1990.
- 36) Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Mendrick, D. L
, Cotran, R. S. and Gimbrone, M. A.: Identifi-
cation of an inducible endothelial-leuko-
cyte adhesion molecule. Proc. Natl. Acad. Sci
. USA 84:9238-9242, 1987.
- 37) 山崎正利: マクロファージ介在 ADCC, *Oncol-
ogia*, 1:121-131, 1982.
- 38) 濱岡利之: 癌の免疫を支配する宿主因子 ①
概説, 山村雄一、杉村隆監修; 癌と免疫
第1版, メジカルビュー社, 東京, 11-19ペ-
ジ, 1987.

Target cells	Effector cells	%specific lysis ^a at E:T ratio ^b :			
		100:1	50:1	25:1	12.5:1
Syngeneic tumor cells	Group I TIL ^c	18.7±1.9	15.2±0.1	14.1±0.6	10.2±0.2
	Group I spleen cells ^c	15.3±2.7	11.1±1.7	7.7±1.0	5.5±0.2
	Group N TIL ^d	0	0	0	0
	Group N spleen cells ^d	0	0	0	0
	Normal mouse spleen cells	0	0	0	0
YAC-1 cells	Group I TIL ^c	10.7±2.3	3.0±2.2	2.3±1.7	1.7±1.2
	Group I spleen cells ^c	7.3±0.4	2.8±0.7	1.4±0.7	1.3±0.1
	Group N TIL ^d	1.5±2.1	0.4±1.2	0.4±1.2	0
	Group N spleen cells ^d	3.6±0.7	3.0±0.9	0.5±0.9	0
	Normal mouse spleen cells	0	0	0	0

Table 1

Target cells	Effector cells	E:T ratio ^a	%ADCC ^b at dilution of serum ^c :			
			1/5	1/20	1/80	1/320
Group I TIL ^d		100:1	7.7±0.7	7.3±4.4	0.3±1.7	0
Syngeneic	Group I spleen cells ^d	100:1	20.9±0.5	21.1±4.0	14.8±9.9	9.1±4.4
tumor cells	Group N TIL ^e	100:1	0	0	0	0
	Group N spleen cells ^e	100:1	0	0	0	0

Table 2

Collect a tumoral mass aseptically.

↓
Cut into thin slices with a scissor blade.

↓
Filter with a #150 Pt mesh.

↓
Wash three times with PBS(1,200 rpm for 5 minutes).

↓
Adjust to 1×10^6 to 10^7 with RPMI1640 culture medium added with 5% FBS.

↓
Overlay 4ml of cell suspension gently to 3ml of M-SMF(mouse lymphocyte isolate solution prepared by Japan Antibody Institute).

↓
Centrifuge at 1,200xg for 20 minutes.

↓
Collect lymphocytes (floating like a white band in an intermediate layer).

↓
Wash three times with RPMI1640 culture medium added with 5% FBS. Make it floating in culture broth.

↓
Confirm the viability of cells with trypan blue and adjust to an optimum concentration.

↓
Use for assay.

* Isolate and adjust the spleen cells with a specific gravity centrifugation method according to the same procedures.

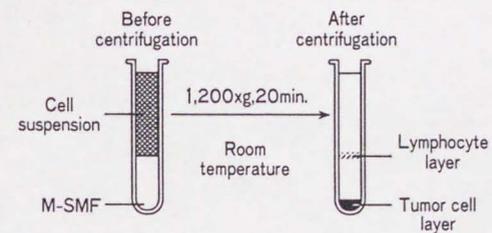


Fig.1

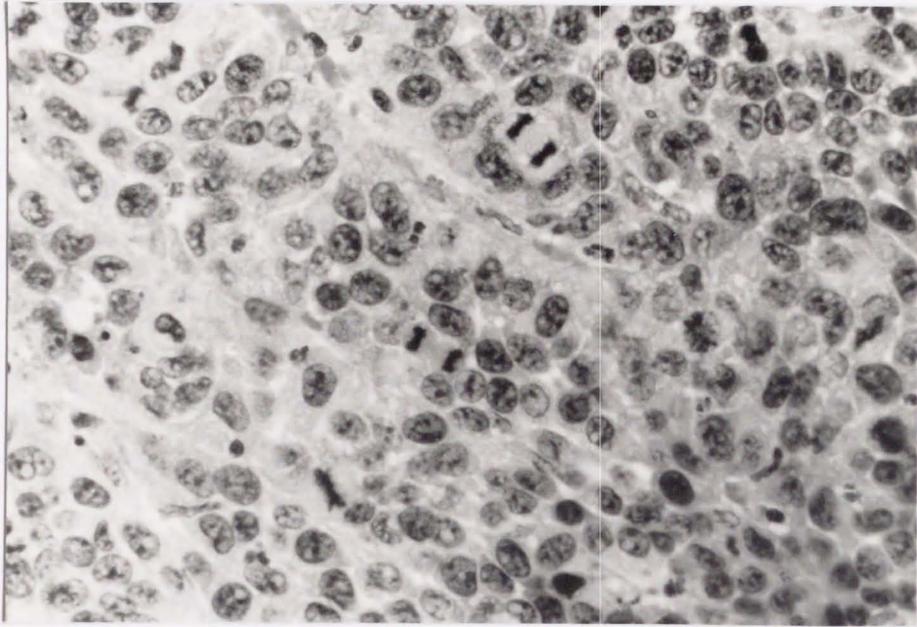


Fig. 2

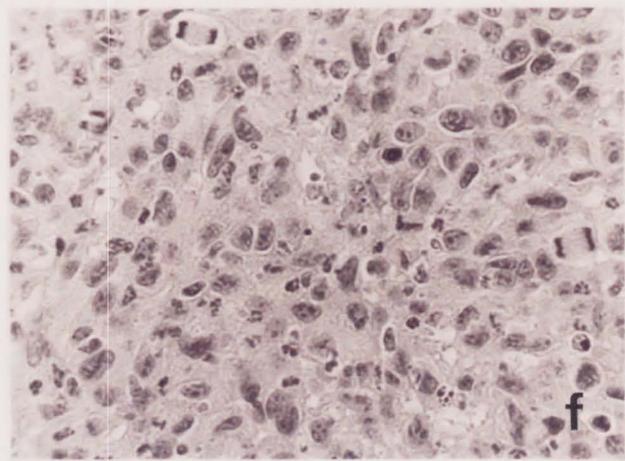
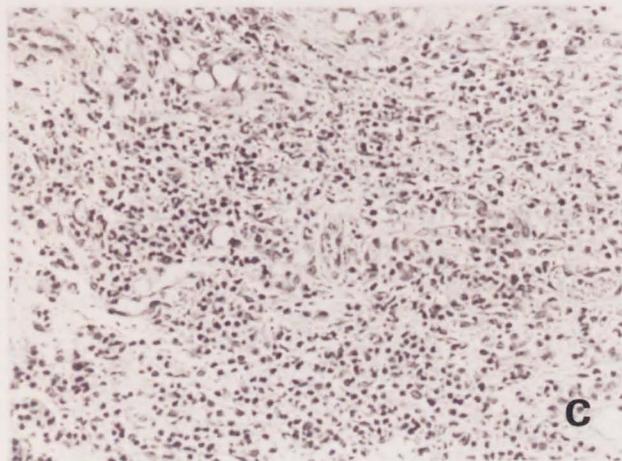
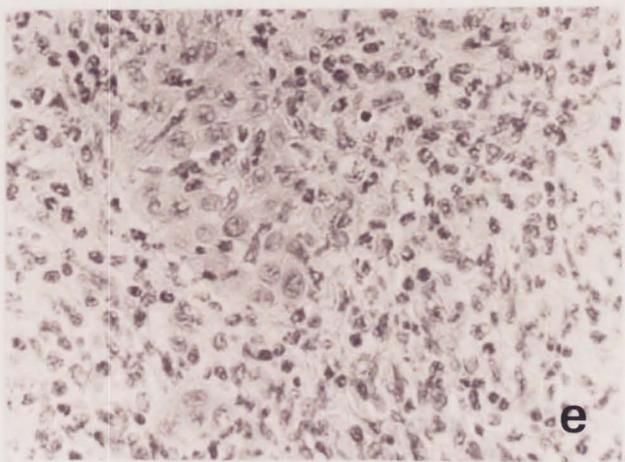
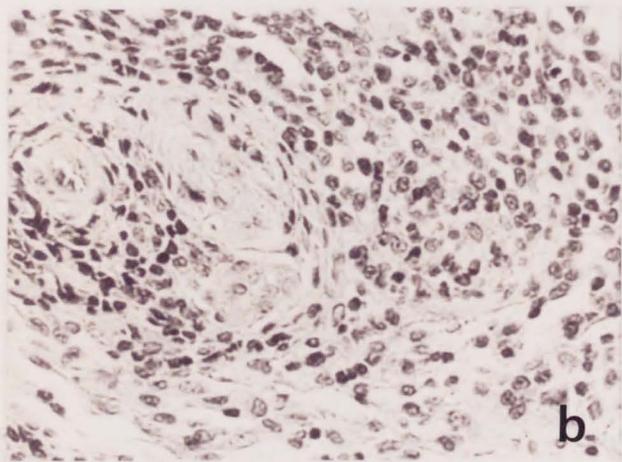
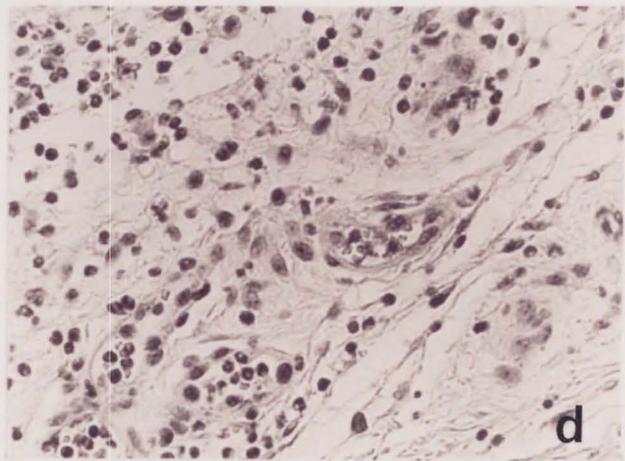
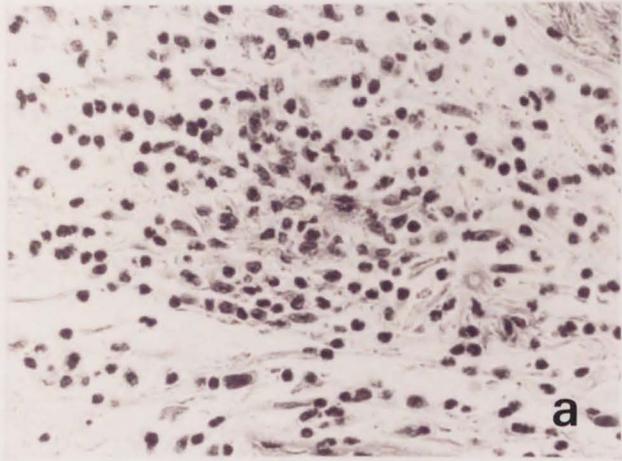


Fig. 3

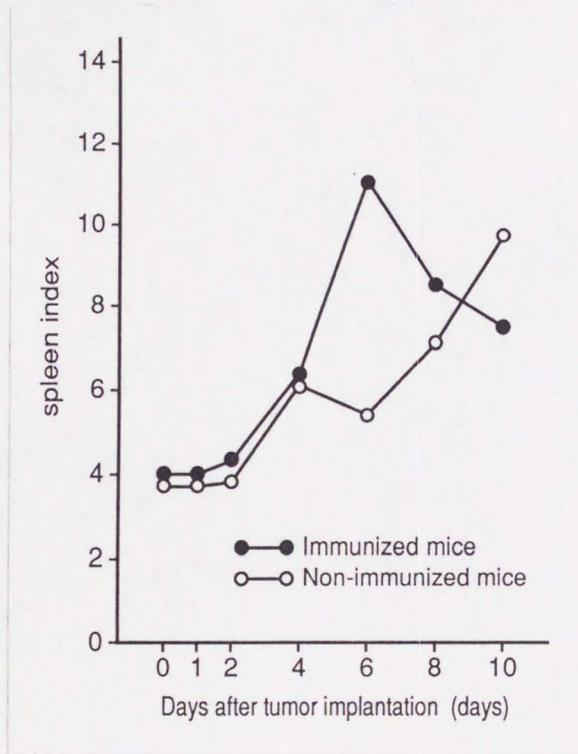


Fig. 4

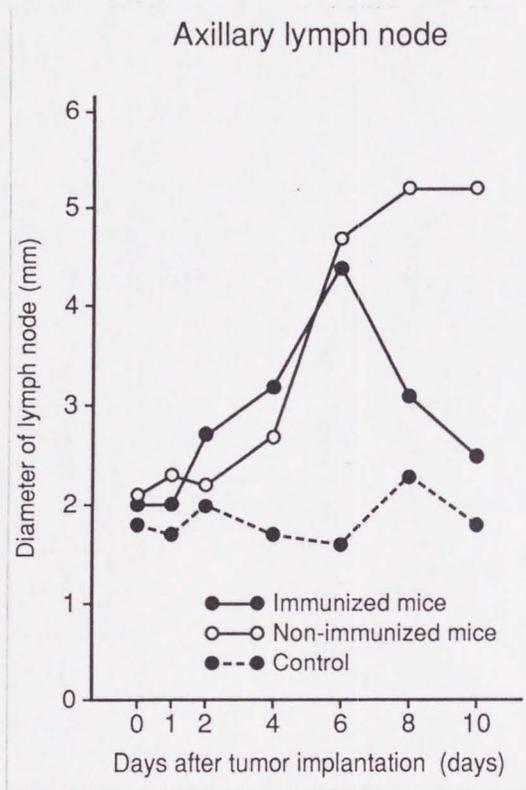


Fig. 5

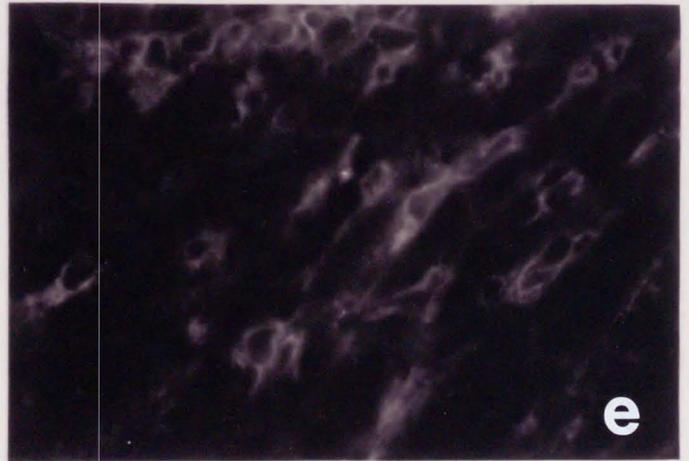
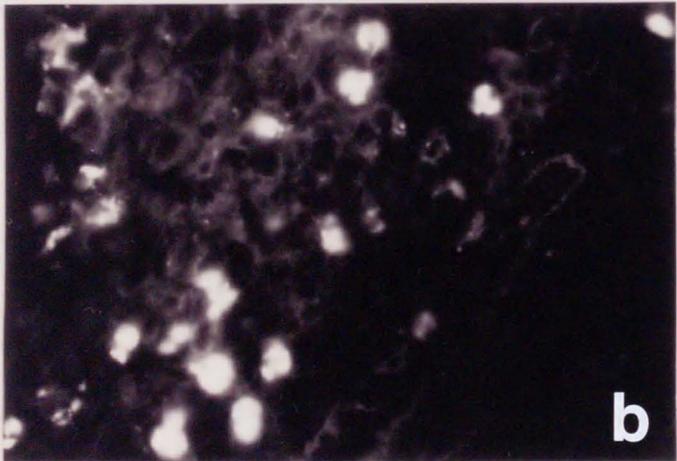
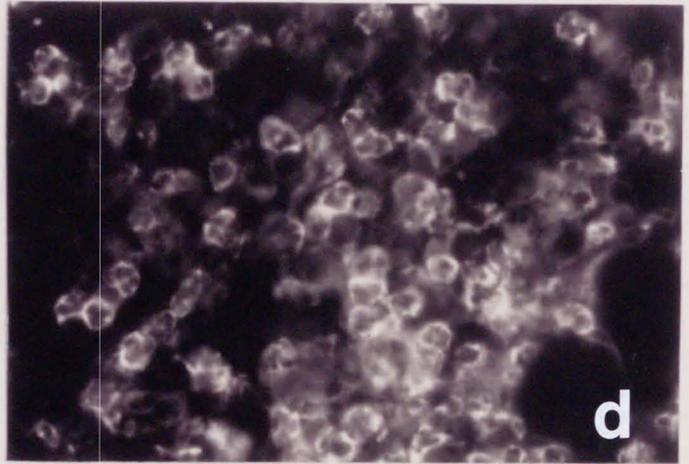


Fig. 6

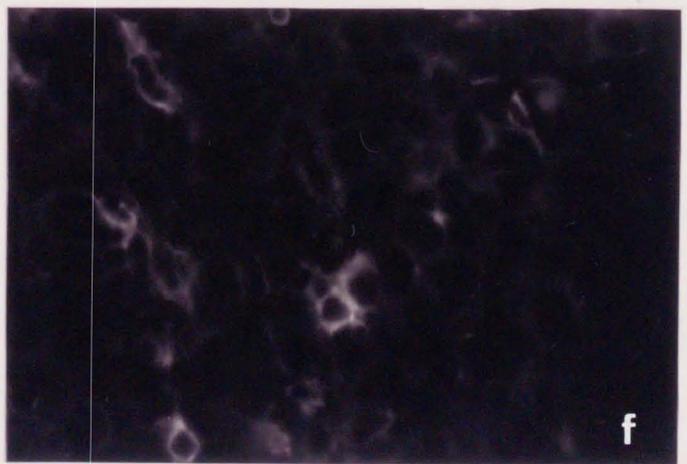
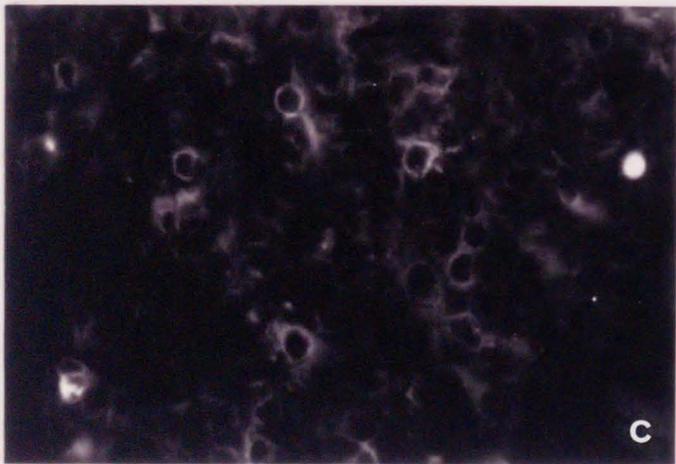
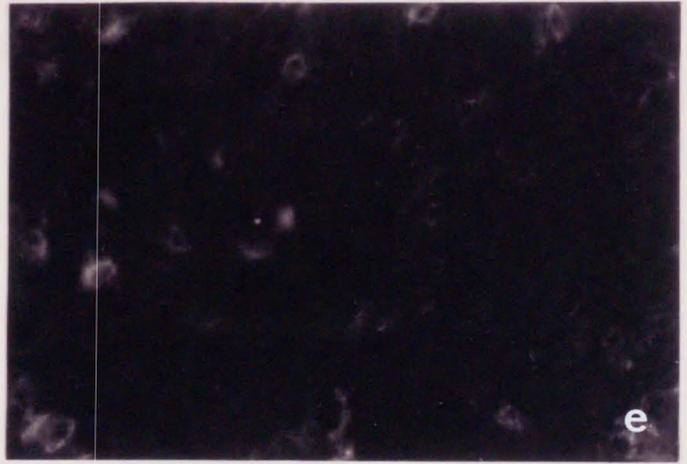
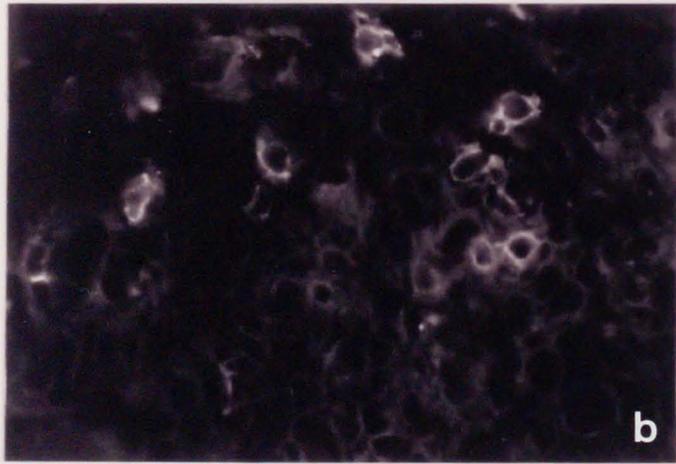
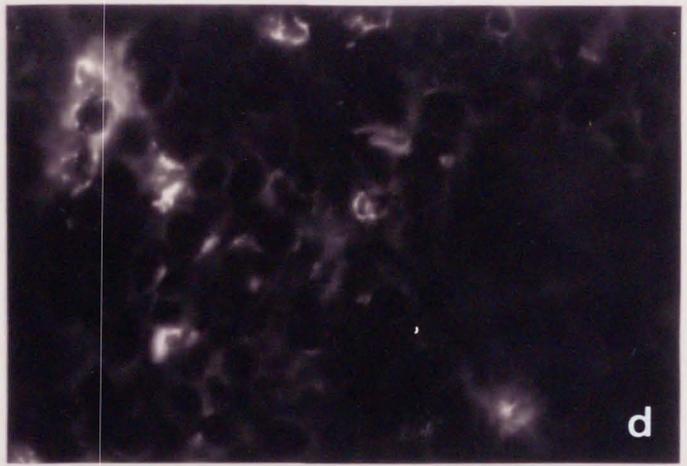
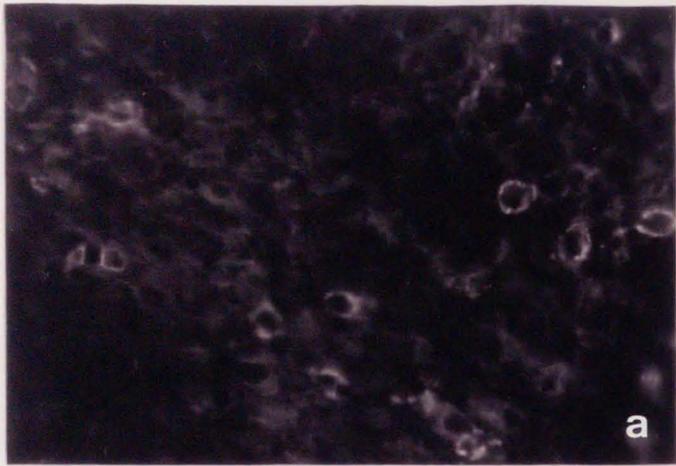


Fig. 7

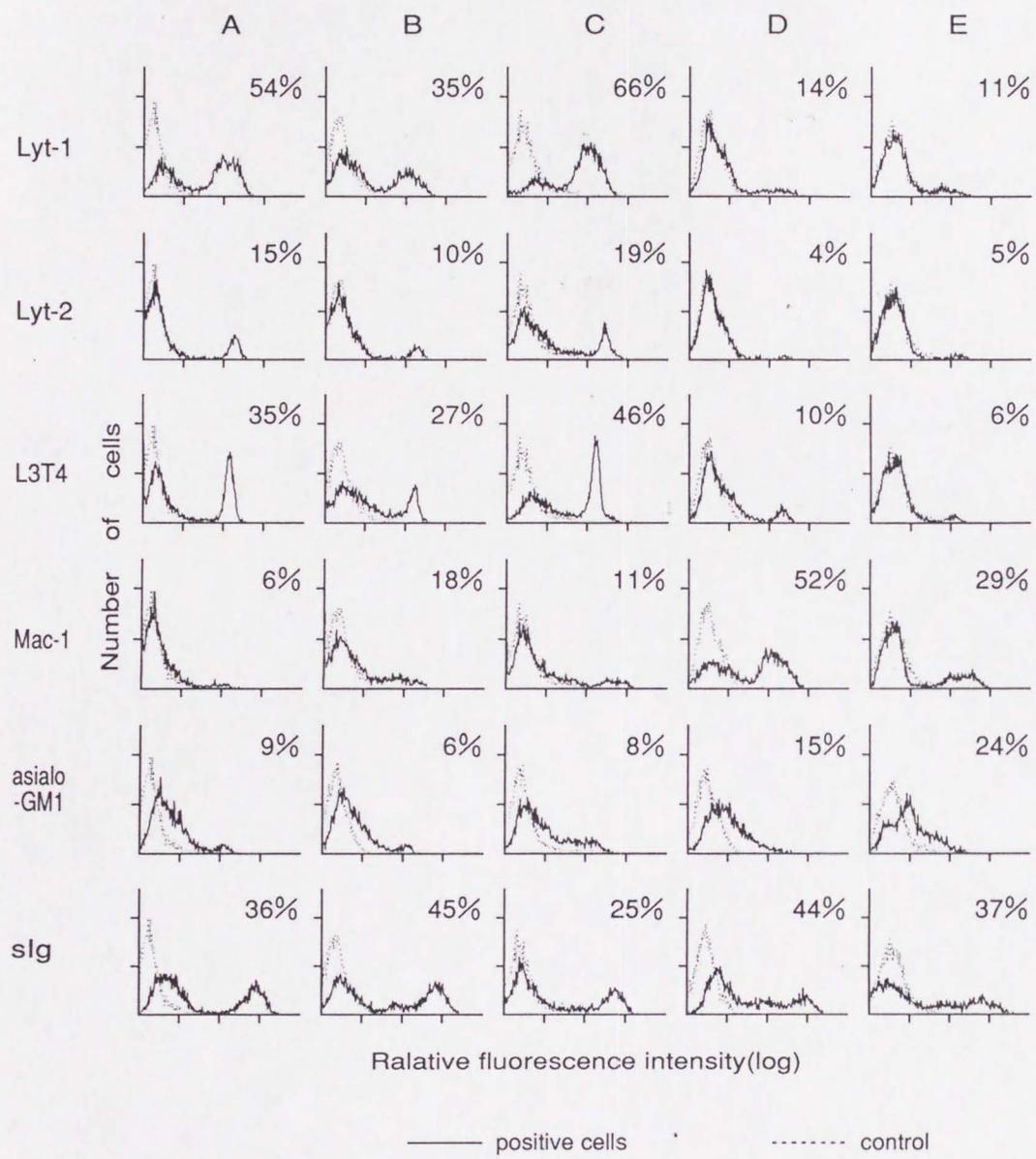
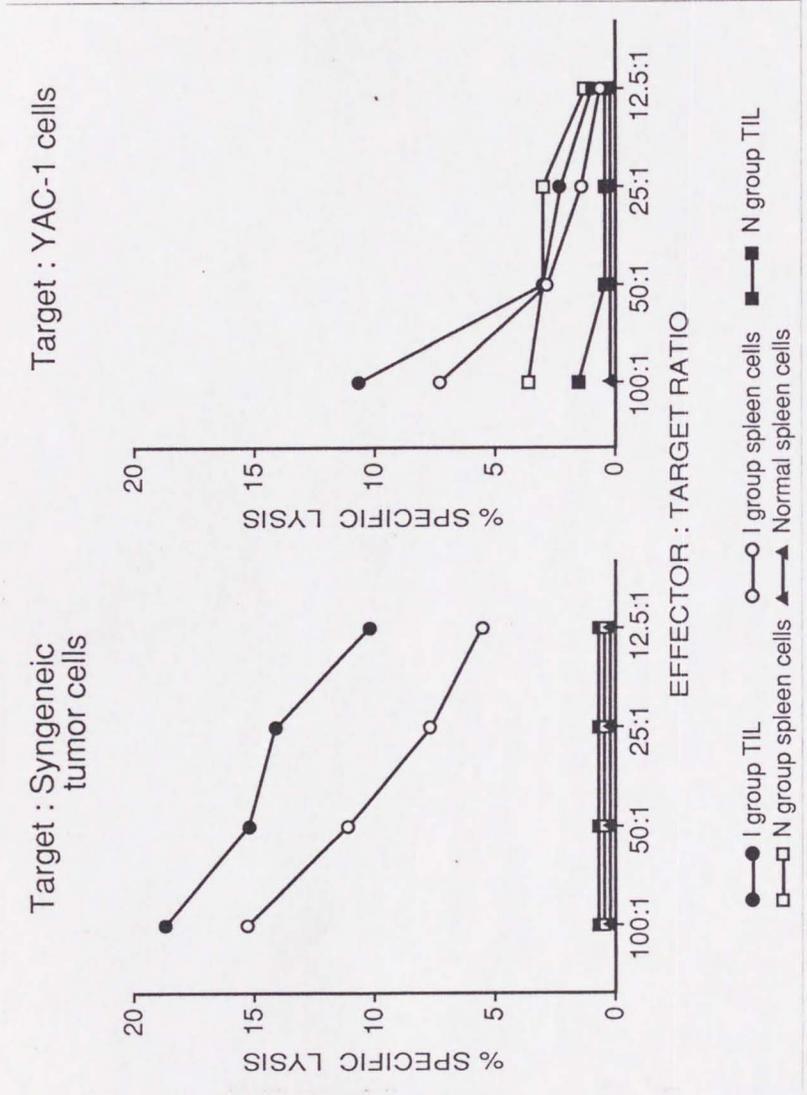


Fig. 8

Fig. 9



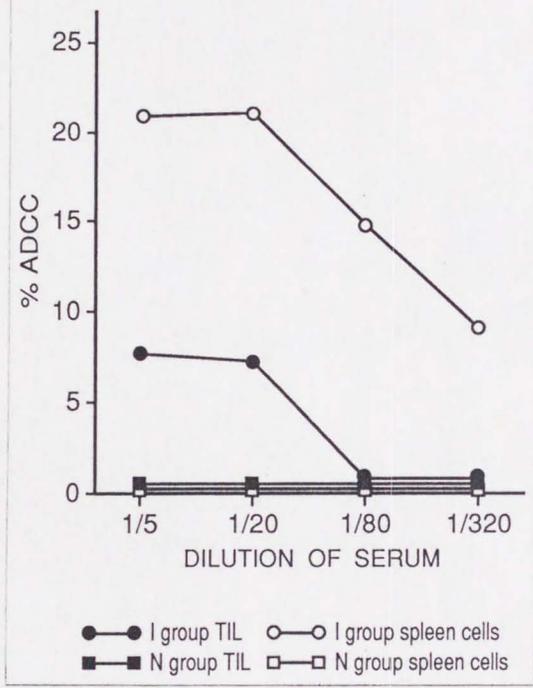


Fig. 10

図表，写真の説明

Table 1 Cytolytic activity of TIL and spleen cells.

a: Values are expressed as mean \pm SEM of three separate experiments.

b: Target cell number is 1×10^4 tumor cells

c: TIL and spleen cells were obtained from immunized mice at the 6th day after implantation of 1×10^6 tumor cells.

d: TIL and spleen cells were obtained from non-immunized mice at the 6th day after implantation of 1×10^6 tumor cells.

Table 2 ADCC of TIL and spleen cells.

a: Target cell number is 1×10^4 tumor cells

b: Values are expressed as mean \pm SEM of three separate experiments.

c: Serum was obtained from immunized and non-immunized mice, and heat inactivated for 30 min at 56°C .

d: TIL and spleen cells were obtained from immunized mice at the 6th day after implantation of 1×10^6 tumor cells.

e: TIL and spleen cells were obtained from non-immunized mice at the 6th day after implantation of 1×10^6 tumor cells.

Fig. 1 Isolation and adjustment of TIL

Fig. 2 Histopathological observation of squamous cell carcinoma spontaneously grown in WHT/Ht mouse (H.E. $\times 400$).

Fig. 3 Histopathological time-course observation on tumor tissues from immunized (a~c) and non-immunized mice (d~f).

a: 2nd day after tumor implantation (H.E. $\times 400$)

b: 6th day after tumor implantation (H.E. $\times 400$)

c: 10th day after tumor implantation (H.E. $\times 400$)

d: 2nd day after tumor implantation (H.E. $\times 400$)

e: 6th day after tumor implantation (H.E. $\times 400$)

f: 10th day after tumor implantation (H.E. $\times 400$)

Fig. 4 Spleen index of immunized and non-immunized mice after implantation of 1×10^6 viable tumor cells. The results are expressed as mean of three mice.

Fig. 5 Kinetic analysis of regional lymphnode's enlargement of immunized and non-immunized mice. Lymphnode's size was taken as the average of the largest lymphnode diameter and a second diameter perpendicular to the first. Lymphnode's size of left regional lymph node on the side of implanted 1×10^6 viable tumor cells was measured at every 2 days and control lymphnode obtained from right regional lymphnode. The diameter of three lymphnodes were plotted together with the mean SEM.

Fig. 6 Immunohistological investigation on TIL from immunized mice at the 6th day after implantation of 1×10^6 tumor cells. TIL were detected by fluorescent antibody method with anti-Lyt-1(a), anti-Lyt-2(b), anti-L3T4(c), anti-Mac-1(d), anti-asialo GM1

(e), and the second antibodies labelled with FITC. FITC-labelled anti-mouse Ig was used for detection of surface Ig(f). ($\times 400$).

Fig. 7 Immunohistological investigation on TIL from non-immunized mice at the 6th day after implantation of 1×10^6 tumor cells. TIL were detected by fluorescent antibody method with anti-Lyt-1(a), anti-Lyt-2(b), anti-L3T4(c), anti-Mac-1(d), anti-asialoGM1(e), and the second anti-bodies labelled with FITC. FITC-labelled anti-mouse Ig was used for detection of surface Ig(f). ($\times 400$).

Fig. 8 Phenotypic analysis of lymphocytes by flow cytometry (FACScan). Lymphocytes were obtained from spleen cells of normal mice (A), spleen cells (B) and TIL (C) of non-immunized mice at the 6th day after tumor implantation, and spleen cells (D) and TIL (E) of immunized mice at the 6th day after tumor implantation. These were stained

using various monoclonal antibodies (anti-Lyt-1, Lyt-2, L3T4, Mac-1, asialoGM1) to the surface markers shown and FITC-labelled secondary antibodies. FITC-labelled anti-mouse Ig was used for detection of surface Ig.

Fig. 9 Cytolytic activity of TIL (● — ●) and spleen cells (○ — ○) at the 6th day after implantation of tumor being rejected in immunized mice, TIL (■ — ■) and spleen cells (□ — □) at the 6th day after implantation of tumor of non-immunized mice, and spleen cells (▲ — ▲) from normal mice. These lymphocytes were tested for cytolytic activity against fresh syngeneic tumor cells and YAC-1 cells at effector: target (E:T) ratio of 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1 in a 12 hours ⁵¹Cr release assay. Values represent mean of percent specific lysis from the triplicate determinations.

Fig. 10 ADCC of TIL (● — ●) and spleen cells (○ — ○) at the 6th day after implan-

tation of tumor of immunized mice,
TIL (■ —■) and spleen cells (□ —□) at
the 6th day after implantation of tumor of
non-immunized mice. ADCC was determined by
6 hours ^{51}Cr release assay at E:T ratio of
100:1 in the presence of serum which was
obtained from immunized and non-immunized
mice. Values represent mean of percent spe-
cific lysis from the triplicate determina-
tions for each dilution of serum.



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

