Osaka University Knowledge Archive

Title	C3Hマウス脾細胞のMH134肝癌細胞に対する抗腫瘍活性への放射線の効果
Author(s)	信澤, 宏; 峰須, 玲子
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1991, 51(12), p. 1481-1488
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/17653
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

日本医放会誌：51（12），1481—1488，1991（平3）

C3H マウス脾細胞の MH134肝癌細胞に対する抗腫瘍活性への放射線の効果

1）昭和大学医学部放射線医学教室（主任　菱田豊彦教授）
2）昭和大学歯学部歯科放射線学教室（主任　岡野友宏教授）
信　澤　　宏[1)]　蜂　須　玲　子[2)]

（平成2年8月30日受付）
（平成3年3月14日最終原稿受付）

Radiation Effect on Anti-Tumor Activity of C3H Mouse Spleen Cells to MH134 Hepatoma Cells

Hiroshi Nobusawa[1)] and Reiko Hachisu[2)]
1) Department of Radiology, School of Medicine, Showa University
2) Department of Oral Radiology, School of Dentistry, Showa University

Research Code No. : 405.9

Key Words : Anti-tumor immunity, Mouse, Radiosensitivity, In vivo

Tumor-specific immunity was induced in C3H mice by immunizing with syngeneic MH134 hepatoma cells. The radiation sensitivity of tumor-specific effector cells in the immunized spleen cells and that of non-specific effector cells in normal spleen cells were compared.

The spleen cells, both immunized and normal, were irradiated in vitro, then mixed with the tumor cells. The anti-tumor activity of the cells was measured by Winn assay and by a cytostatic test in vivo with diffusion chambers, on the basis of growth inhibition of tumor cells.

The growth of tumor cells was inhibited by immune spleen cells more effectively than by normal spleen cells. The anti-tumor activity of immunized and normal spleen cells decreased dose-dependently in the respective ranges of 2.5—20 Gy and 2.5—10 Gy irradiation. In the normal spleen cells, anti-tumor activity was mainly detected in the fraction of non-adherent cells, not in adherent cells. The anti-tumor activity of non-adherent cells was diminished with 2.5 Gy irradiation.

These results indicated that the radioresistance of anti-tumor effector cells in C3H mice was increased by immunization with syngeneic MH134 hepatoma cells. Based on these and other findings in this experimental system, we concluded that tumor-specific effector cells that were radiosensitive at 10—20 Gy might involve delayed-type hypersensitivity (DTH) effector cells (macrophages) and that non-specific effector cells that were radiosensitive at 2.5—10 Gy might involve natural killer cells and lymphokine-activated killer cells.

はじめに

抗腫瘍免疫に関するエフェクター細胞の放射線感受性は in vitro においては多く報告されている．しかし in vitro で細胞障害性を発現するエフェクター細胞が in vivo で必ずしも抗腫瘍活性を発現するとは限らない[1)2)]．In vivo において発

現する腫瘍免疫のエフェクター細胞が解明されている実験系は少いので，その抗腫瘍活性への放射線の効果は明らかではない．

MH134肝癌細胞に対するC3Hマウス脾細胞の抗腫瘍免疫は，in vivoでの腫瘍特異的免疫のエフェクター細胞が比較的解明されている実験系である[2)~8)]．そこで，我々はこの実験系を用いてin vivoにおける抗腫瘍活性への放射線の効果を調べた．

本実験では，MH134肝癌細胞に対するC3Hマウス免疫脾細胞と正常脾細胞の抗腫瘍活性およびその放射線感受性を調べ，放射線が腫瘍特異的免疫と非特異的免疫におよぼす効果をin vivoにおいて，腫瘍中和試験（Winn assay）[9)]とチェンバー法[10)]で比較検討した．

実験材料及び方法

1. 実験動物

7～8週齢の雄性，C3Hマウス（日本チャールスリバー社）を用いた．

2. 腫瘍細胞

C3Hマウスの同系腫瘍であるMH134肝癌細胞（大阪大学医学部癌研究施設より供与された）を，7日毎に腹水継代培養して用いた．マウス腹水を採取し，RPMI-1640培養液（日水製薬）を加え，400rpmで5分間遠心した．遠心・洗浄を3回繰り返した後，10%牛胎児血清（FCS；Gibco社）添加RPMI-1640培養液を加え細胞浮遊液とした．

3. マウスの免疫

腫瘍細胞（2×10^6個/0.1ml）を同系正常マウスの背部皮内に接種し，1週間後に発育した腫瘍を外科的に切除した．さらに1週間後に再度腫瘍細胞（2×10^5個/0.1ml）を背部皮内に接種し，1週間後に腫瘍が発育しなかったマウスを，免疫マウスとして実験に使用した．

4. 脾細胞

C3Hマウスの免疫脾細胞並びに正常脾細胞を用いた．マウスの脾臓を摘出し，RPMI-1640培養液に浸漬した．21G針付きディスポ注射器を用いて，培養液を数回脾臓内に注入することにより，脾細胞を培養液中に浮遊させた．この浮遊液を1,200rpmで5分間遠心した．遠心・洗浄を3回繰り返した後，培養液を加え脾細胞浮遊液とした．

脾細胞の付着性細胞分画と非付着性細胞分画の分取は以下の方法によった．脾細胞浮遊液をプラスチックシャーレに入れて，炭酸ガス培養器（5% CO_2，37%）内で40分間培養した．シャーレを振盪した後，培養液に含まれる非付着性細胞と，シャーレに付着する細胞を分離した．各々別々に細胞浮遊液を作製し，プラスチックシャーレに入れて，再度40分間培養した．2回とも付着性もしくは非付着性を示した細胞を回収し，細胞浮遊液を作製した．この方法で得られる付着性細胞の85%は，ラテックス粒子貪食能を有しており，マクロファージと考えられた．

5. 放射線照射

脾細胞は細胞浮遊液（1×10^8個/0.1ml）として，in vitroで照射した．装置はコバルト60（東芝RCR-120-CI型治療装置）を用い，STD 0.5m，空間線量率6.6×10^{-4}C/kg/sec（150R/min）で照射した．

6. 腫瘍中和試験（Winn assay）[9)]による抗腫瘍活性の検討

免疫または正常脾細胞を，腫瘍細胞（2.5×10^6個）に対して脾細胞：腫瘍細胞比（effector : target ratio, E : T比），10：1～100：1の種々の割合で混合した．この0.1mlを正常C3Hマウスの背部皮内に接種した．発育した腫瘍塊の長径（A），短径（B）高さ（C）を経日的に測定し腫瘍体積（V）を近似計算した（$V=\pi\times A\times B\times C\div6$，$\pi$は円周率）．対照群は腫瘍細胞（$2.5\times10^5$個/0.1ml）のみをマウス背部に接種した．

7. チェンバー法による腫瘍増殖抑制効果の検討

藤原らの方法[10)]に従い，チェンバー（diffusion chamber）を用いて，in vivoで腫瘍増殖抑制効果（%cytostasis）を測定した．チェンバーは，内径12mm，外径14mm，厚さ2mmのプラスチックリング（ミリポア社）の両側に，半透膜のミリポアフィルター（ポアサイズ0.22μm，ミリポア社）を貼って作製した．

免疫脾細胞または正常脾細胞に，各々0～30Gy，0～10Gyの線量を照射した後に，脾細胞（1×10^7

個）と腫瘍細胞（1×10⁴個）をE：T比1,000：1で混合した．この混合液0.1mlをリングの小穴からチェンバー内に注入した．小穴はプラスチック棒とノン・トキシックセメント（ミリポア社）を用いて閉じた．ネンブタール麻酔下にチェンバーをマウス腹腔内に挿入して，in vivoで細胞を培養した．3日間培養後にチェンバーを取り出し，チェンバー内容（ゲル状の場合が多い）をピペットで回収した．回収した内容物に0.5%-pronase（日水製薬）を加え，ゲルを溶解させ細胞を浮遊させた．1,200rpmで5分間遠心した後，10%-FCS添加RPMI-1640培養液で洗浄し，1,200rpmで5分間の遠心を2回繰り返した．3回目の遠心・洗浄が終った後，細胞遠心機（Shandon社，cytospin-2）を用いて1,000rpmで1分間遠心した．細胞をスライドグラスに遠心付着させ標本をライト・ギムザ染色した後，腫瘍細胞数を検鏡測定した．腫瘍細胞は脾細胞に比べて，細胞質が大きい，核・細胞質比が大きい，核小体が著明である，異型性に富む，ことから腫瘍細胞と脾細胞を区別した．対照群は，腫瘍細胞（1×10⁴個/0.1ml）のみをチェンバーに入れ培養した．

結　果

1．免疫脾細胞と正常脾細胞の抗腫瘍活性の検討（腫瘍中和試験）

免疫または正常の脾細胞を種々のE：T比で腫瘍細胞と混合してマウス皮内に接種し，腫瘍中和試験を行った．Table 1に16日後の腫瘍体積を示した．免疫脾細胞はE：T比10：1～40：1において腫瘍発育を完全に抑制し，強い抗腫瘍活性を示した．一方，正常脾細胞は抗腫瘍活性が弱く，E：T比20：1では，対照群と比較して77%に相当する体積の腫瘍が発育した．E：T比が増すにつれ腫瘍発育抑制効果が増強し，100：1では33%まで抑制した．この様に，正常脾細胞でも免疫脾細胞よりは弱いが抗腫瘍活性が認められた．

2．免疫脾細胞の抗腫瘍活性に対する放射線の効果（腫瘍中和試験）

免疫脾細胞をE：T比，20：1で腫瘍細胞に加えて，腫瘍中和試験を行った．免疫脾細胞にはあらかじめ0～20Gyの線量を照射した．脾細胞の照射線量と腫瘍の生着率の関係をTable 2に示した．非照射の免疫脾細胞の場合は，腫瘍は生着しなかった．2.5Gy以上照射すると線量の増加とともに生着率は増加し，20Gyでは100%生着した．Fig. 1には生着した腫瘍の発育を平均体積で示した．抗腫瘍活性は，2.5Gy以上照射すると線量の増加と共に低下し，20Gyで消失した．

Table 1　Anti-tumor activity of immunized and normal spleen cells. The activity in the inhibition of tumor growth was examined by Winn assay. Tumor cells (2.5×10^5 cells) and immunized spleen cells or normal spleen cells were mixed in various ratio (Effector : Target ratio, E : T ratio) and then inoculated into mice intradermally. Tumor volume was measured 16 days after the inoculation. Each value represents mean value of 6 experiments.

Spleen cells	E : T ratio	Tumor volume (% of control)
none	—	100
immunized spleen cells	10 : 1	0
	20 : 1	0
	40 : 1	0
normal spleen cells	20 : 1	77
	30 : 1	55
	50 : 1	56
	100 : 1	33

Table 2　Relationship between irradiated dose of immunized spleen cells and incidence of tumor growth in Winn assay. Immunized spleen cells were irradiated with 2.5—20Gy. Tumor cells (2.5×10^5 cells) and the immunized spleen cells (E: T ratio=20 : 1) were mixed and then inoculated into mice intradermally. Incidence of tumor growth were measured 16 days after the inoculation. Ten animals were used in each group.

Irradiated dose (Gy)	Incidence of tumor growth
0	0/10
2.5	3/10
5	7/10
10	8/10
20	10/10

3．免疫脾細胞の抗腫瘍活性に対する放射線の効果（チェンバー法）

腫瘍中和試験では，腫瘍細胞以外の間質を含む

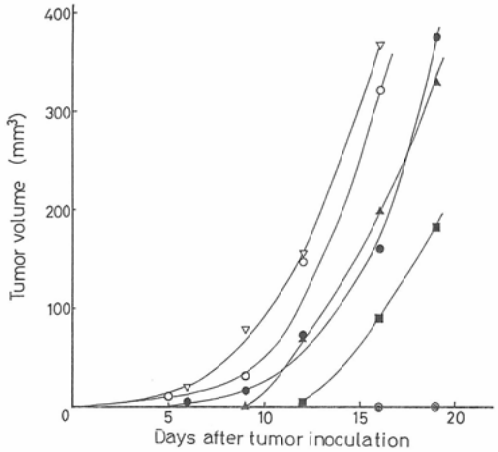

Fig. 1 Decrease in anti-tumor activity of immunized spleen cells after irradiation. The activity in the inhibition of tumor growth was examined by Winn assay. Tumor cells (2.5×10^5cells) and immunized spleen cells (E: T ratio=20:1) were mixed and then inoculated into mice intradermally. Tumor cells: ▽, Tumor cells+immunized spleen cells irradiated with 0Gy : ◎, 2.5Gy : ■, 5 Gy : ▲, 10Gy : ●, 20Gy : ○. Each point represents mean value of 10 experiments.

腫瘍体積により抗腫瘍活性を測定した．以下の実験では，腫瘍増殖抑制効果をより定量的に評価するために，発育した腫瘍細胞数をチェンバー法を用いて測定した．E:T比を100：1にして行った場合には，腫瘍細胞の発育抑制は明らかでなかった．チェンバー内容がゲル状になる場合が多いため，腫瘍細胞と脾細胞の接触性が良好でなく，E:T比を高くしないと抗腫瘍活性が観察しにくかった．従って藤原ら[10]と同様に，チェンバー法ではE:T比は1,000：1で実験を行った．

免疫脾細胞に0～30Gy照射した後の抗腫瘍活性をFig. 2に示した．非照射の免疫脾細胞を腫瘍細胞に加えて培養すると，発育した腫瘍細胞数は，腫瘍細胞のみを培養した対照群の29%に抑制された．免疫脾細胞に1.25Gy照射した場合は，腫瘍細胞数は非照射群と同程度であり腫瘍増殖は抑制された．これに対して，2.5～10Gy照射した免疫脾細胞では腫瘍細胞は発育し，20Gy照射免疫脾細胞では再び対照群と同様に腫瘍細胞が増殖した．従って，免疫脾細胞の抗腫瘍活性は1.25Gyまでの放射線には抵抗性であるが，2.5～20Gyの放射線照射で抗腫瘍活性は低下した．

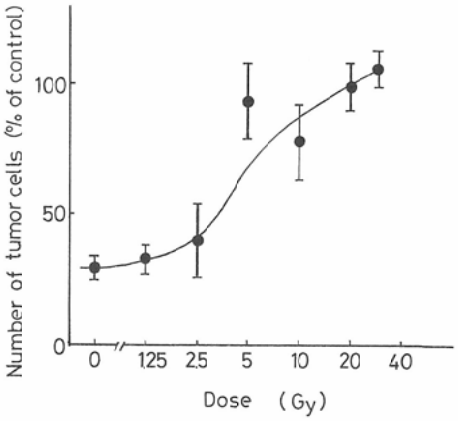

Fig. 2 Decrease in cytostatic activity of immunized spleen cells after irradiation. Immunized spleen cells (1×10^7cells) were irradiated and then mixed with tumor cells (1×10^4cells). After 3-day culture of the mixed cells, number of the tumor cells was determined. Each point represents mean±SE of 6～20 experiments.

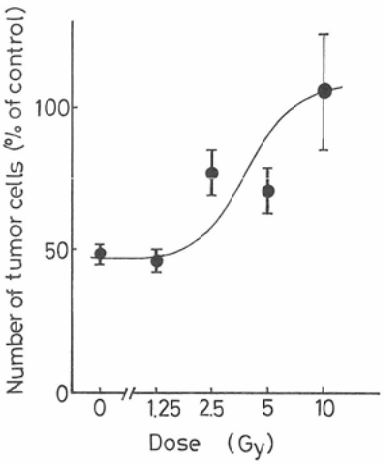

Fig. 3 Decrease in cytostatic activity of normal spleen cells after irradiation. Normal spleen cells (1×10^7cells) were irradiated and then mixed with tumor cells (1×10^4cells). After 3-day culture of the mixed cells, number of the tumor cells was determined. Each point represents mean±SE of 6～12 experiments.

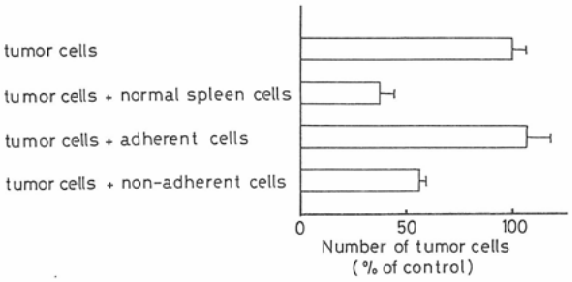

Fig. 4　Cytostatic activity of normal spleen cells. Normal spleen cells were divided into two fractions, adherent cells and non-adherent cells. Each fraction of cells (1×10^7cells) were mixed with tumor cells (1×10^4cells). After 3-day culture of the mixed cells, number of the tumor cells was determined. Each point represents mean±SE of 6～12 experiments.

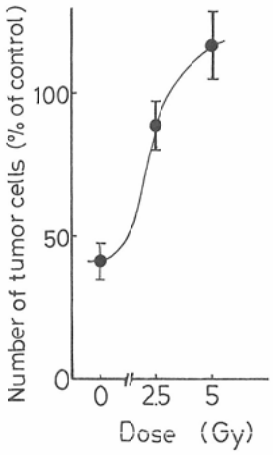

Fig. 5　Cytostatic activity of non-adherent normal spleen cells after irradiation. The cells (1×10^7 cells) were irradiated and mixed with tumor cells (1×10^4cells). After 3-day culture of mixed cells, number of the tumor cells was determined. Each points represents mean±SE of 6 experiments.

4. 正常脾細胞の抗腫瘍活性に対する放射線の効果（チェンバー法）

正常脾細胞に0～10Gy 照射した後の抗腫瘍活性を Fig. 3 に示した．非照射の正常脾細胞を腫瘍細胞に加えた場合，発育した腫瘍細胞数は対照群の49%に抑制された．正常脾細胞に1.25Gy 照射した場合は，非照射群と同程度であった．2.5～5 Gy 照射では腫瘍細胞は発育し，10Gy では対照群と同様の発育がみられた．従って，正常脾細胞にも腫瘍抑制効果が認められ，その抗腫瘍活性は1.25Gy までは放射線に抵抗性であるが，2.5～10 Gy の放射線照射で抗腫瘍活性は低下した．

免疫脾細胞の腫瘍抑制効果が正常脾細胞に比べて強いか否かを線量毎に検討した．統計処理は Student't 検定を行った．0Gy では $p<0.05$で免疫脾細胞の腫瘍抑制効果は正常脾細胞に比べて強かった．1.25Gy，2.5Gy，10Gy では有意差は認められないが，$p<0.1$で，免疫脾細胞の腫瘍抑制効果は正常脾細胞に比べて強い傾向を認めた．5Gy では有意差や傾向は認めなかった．

5. 正常脾細胞の抗腫瘍活性；付着性細胞と非付着性細胞の比較（チェンバー法）

腫瘍細胞に，正常脾細胞から分離した付着性細胞または非付着性細胞を加えて培養した結果を Fig. 4 に示した．付着性細胞を加えた場合，発育した腫瘍細胞数は対照群と同様であるが，非付着性細胞を加えると，対照群の55%に抑制された．この事より，正常脾細胞の抗腫瘍活性は，主に非付着性細胞群に存在する事がわかった．非付着性細胞単独の抗腫瘍活性は，Student't 検定では $p<0.05$で，正常脾細胞の抗腫瘍活性より弱かった．

6. 非付着性細胞の抗腫瘍活性に対する放射線の効果（チェンバー法）

Fig. 5 に示すように，非照射の非付着性細胞は腫瘍発育を抑制した．しかし，2.5，5Gy 照射により非付着性細胞の腫瘍発育抑制効果は消失した．

考　察

1. 抗腫瘍活性を担当する免疫系細胞

MH134肝癌細胞に対する C3H マウス脾細胞の腫瘍免疫系では，腫瘍特異的 T 細胞から分泌されるサイトカインがマクロファージを活性化することが，in vivo で発現する腫瘍特異的免疫において重要であると報告されている[3)~7)]．この腫瘍特異的 T 細胞は，hyper-immune state[6)7)]（今回の免疫マウスを更にもう一度腫瘍細胞でチャレンジして，腫瘍が発育しなかったマウスの脾細胞）では Lyt-2^+・T 細胞（DTH 反応に関係ない）も関与する[6)7)]が，通常の immune state[2)5)]（本実験と同じ免疫脾細胞）では L3T4^+（Lyt-1^+）・T 細胞（DTH

反応に関係あり）のみと考えられている[2)5)]．従って，本実験での抗腫瘍免疫はマウス足蹠反応を利用すれば遅延型過敏症反応（DTH 反応）として観察される[8)11)]．一方，細胞障害性 T リンパ球や腫瘍特異的抗腫瘍抗体は in vivo での抗腫瘍活性には関与しないと報告されている[2)]．本実験系では正常脾細胞の非特異的抗腫瘍活性に関する報告はない．

本実験では免疫脾細胞は正常脾細胞より強い抗腫瘍活性を持つことを認めた（Table 1）．免疫脾細胞では DTH 反応などの T 細胞が関与する腫瘍特異的な抗腫瘍活性が発現したためと考えられる．

正常脾細胞にも腫瘍発育抑制効果が認められた．非特異的抗腫瘍活性を発現する細胞は，natural killer（NK）細胞，lymphokine activating killer（LAK）細胞，マクロファージや多形核白血球（好中球）などであると考えられている[12)~14)]．正常脾細胞の抗腫瘍活性は非付着性細胞分画に認められ，マクロファージを主体とする付着性細胞分画には認められなかった（Fig. 4）．NK 細胞や LAK 細胞や多形核白血球は非付着性細胞に含まれるので，本実験での非特異的抗腫瘍活性は，これらの細胞に依存した可能性が考えられる．

マクロファージが産生する interleukin-1 や TNF-α などのモノカインには NK 細胞や多形核白血球の活性を増強させる作用がある[15)]．正常脾細胞はその非付着性細胞分画より強い抗腫瘍活性を示した（Fig. 4）．この理由として，マクロファージが存在する場合には，モノカインを介して NK 細胞もしくは多形核白血球の抗腫瘍活性が増強した可能性が考えられる．

2. 非特異的抗腫瘍活性に対する放射線の効果

In vitroでは，NK細胞の抗腫瘍活性は1～5Gy[16)]，4～8Gy[17)]，1.5Gy[18)]で低下することが報告されている．本実験では非付着性細胞の抗腫瘍活性は2.5 Gy の照射により消失した（Fig. 5）．このことは線量的には，NK 細胞の放射線感受性にほぼ一致する．従って，NK 細胞の抗腫瘍活性が2.5Gy で失活した可能性が考えられた．

本実験系では5Gy 照射により非付着性細胞の抗腫瘍活性は完全に消失した（Fig. 5）が，正常脾細胞の抗腫瘍活性は完全に消失しなかった（Fig. 3）．この理由の1つとしては，照射時もしくは照射後にマクロファージが存在する場合には，放射線照射後に生存した NK 細胞がマクロファージから分泌されたモノカインにより活性化された可能性がある．事実，4～8Gy 照射した NK 細胞を interferon-β を添加して培養すると，添加しない場合にくらべて NK 活性は増強すると報告されている[17)]．

LAK 活性は interleukin-2の存在下に NK 細胞または T 細胞から誘導される[13)]．LAK 細胞の前駆細胞に5Gy 照射した後 interleukin-2を添加すると誘導される LAK 活性は低下しないが，10Gy 照射すると誘導される LAK 活性は低下する[19)]．本実験系において正常脾細胞の抗腫瘍活性は10 Gy で消失した（Fig. 3）ことは，線量的には，in vitro での LAK 細胞の前駆細胞の放射線感受性に一致する．

多形核白血球は，in vitro で500Gy 照射しても貪食能が保たれる[20)]ことから，放射線に強い抵抗性を示すと考えられる．従って，2.5～10Gy 照射で抗腫瘍活性を失なった非特異抗腫瘍活性が多形核白血球であるとは考えにくい．以上のことより，本実験で認められた非特異的抗腫瘍活性は NK 細胞と LAK 細胞に依存すると考えられる．

3. 腫瘍特異的抗腫瘍活性に対する放射線の効果

我々は，本実験系で誘導される腫瘍特異的 DTH 反応が12～24Gy の範囲の放射線照射で低下することを以前に報告した[11)]．免疫脾細胞に20 Gy 照射して DTH 反応を低下させた場合に，照射後の免疫脾細胞に正常脾細胞の付着性細胞（マクロファージ）を加えると DTH 反応は回復した．しかし，非付着性細胞を加えても DTH 反応は回復しなかった[11)]．DTH 反応では T 細胞（T_{DTH}）から分泌されるマクロファージ活性化因子などのサイトカインがマクロファージを活性化させる．従って，12～24Gy では DTH 反応を発現するマクロファージが失活し，腫瘍特異的 T_{DTH}細胞は20 Gy では失活しないと考えられた[11)]．

免疫脾細胞の抗腫瘍活性は2.5～20Gyの広い範囲で線量に依存して低下した(Fig. 1, 2, Table 2). 正常脾細胞の抗腫瘍活性は10Gyで消失したので，それ以上の線量域すなわち10～20Gy照射では腫瘍特異的抗腫瘍活性が低下したと考えられる．これは線量的には，DTH反応を発現するマクロファージの放射線感受性にほぼ一致する．本実験ではDTH反応が腫瘍特異的抗腫瘍活性を発現し，DTH反応のエフェクター細胞であるマクロファージの活性が10～20Gy照射により消失したと考えられた．

正常脾細胞の抗腫瘍活性は2.5～20Gyで失活した．一方，免疫脾細胞ではDTH反応が発現し，DTH反応は少なくとも12Gyでは抗腫瘍活性を失わないと考えられた[11]．免疫脾細胞の抗腫瘍活性が正常脾細胞に比べてより放射線抵抗性になったのは，DTH反応が放射線抵抗性であるためと考えられた．

まとめ

C3Hマウス脾細胞のMH134肝癌細胞に対する抗腫瘍活性の放射線感受性について，in vivoで検討した．

1. 腫瘍特異的抗腫瘍活性は10～20Gyで低下した．この活性は，DTH反応のエフェクター細胞であるマクロファージの関与が考えられた．

2. 非特異的抗腫瘍活性は2.5～10Gyで低下した．この活性は，NKやLAKの関与が考えられた．

稿を終えるにあたり，実験に御協力頂きました本学中央検査部病理検査室の技師諸氏に感謝致します．また，御校閲いただきました菱田豊彦教授・岡野友宏教授，御査読いただきました先生方に深謝いたします．なお，本論文の一部は第48回日本医学放射線学会総会（1989，神戸）にて発表した．

文　献

1) Fujiwara H, Fukuzawa M, Yoshioka T, et al: The role of tumor-specific Lyt-1+2− T cells in eradicating tumor cells in vivo. 1. Lyt-1+2− T cells do not necessarily require recruitment of host's cytotoxic T cell precursors for implementtion of in vivo immunity. J Immunol 133: 1671—1676, 1984
2) Fukuzawa M, Fujiwara H, Yoshioka T, et al: Effector cell analysis of tumor cell rejection in vivo in two syngeneic tumor systems exhibiting distinct in vitro cytotoxic mechanisms. Gann 75: 912—919, 1984
3) 山村雄一，多田富雄（編）：現代免疫学．p246—263，医学書院，東京，1988
4) Hashimoto Y, Hamaoka T (edit): Cellular and molecular mechanisms of tumor immunity. Gann Monograph on Cancer Research, No 34, (1988), p71—79, Japan Scientific Societies Press, Tokyo
5) Sakamoto K, Fujiwara H, Nakajima H, et al: Requirement of adherent cells for activating Lyt-1+2− T cells as well as for functioning as antitumor effectors activated by factor(s) from Lyt-1+2− T cells. Jpn J Cancer Res (Gann) 77: 1142—1152, 1986
6) Yoshioka T, Sato S, Ogata M, et al: Mediation of in vivo tumor-neutralizing activity by Lyt-2+ as well as L3T4+ T cell subset. Jpn J Cancer Res (Gann) 79: 91—98, 1988
7) Sakamoto K, Yoshioka T, Shimazu J, et al: Mechanisms for recognition of tumor antigens and mediation of anti-tumor effect by non-cytolytic Lyt-2+ T cell subset. Jpn J Cancer Res (Gann) 79: 99—108, 1988
8) Tomita S, Fujiwara H, Yamane Y, et al: Demonstration of intratumoral infiltration of tumor-specific Lyt-1+2− T cells mediating delayed-type hypersensitivity response and in vivo protective immunity. Jpn J Cancer Res 8Gann) 77: 182—189, 1986
9) 藤原大美，伊藤喜一郎，浜岡利之：免疫実験操作法 XI．p3667—3672．(Winn assay) 日本免疫学会（編），金沢
10) Fujiwara H, Takai Y, Sakamoto K, Hamaoka T: The mechanism of tumor growth inhibition by tumor-specific Lyt-1+2− T cells. I. Antitumor-effect of Lyt-1+2− T cells depends on the existence of adherent cells. J Immunol 135: 2187—2191, 1985
11) 河原俊司，橋本東児，蜂須玲子：マウスにおける腫瘍特異的遅延型過敏症（DTH）反応に対する放射線の影響，日本医放会誌，49: 675—680, 1989
12) Dixon FJ (edit): Advances in Immunology, Volume 47, 295—296, Academic Press, 1989
13) Ortaldo JR, Mason A, Overton R: Lymphokine-activated killer cells Analysis of progenitors and effectors. J Exp Med 164: 1193—1205, 1986
14) 徳永　徹：マクロファージ．p151，講談社サイエンティフィック，東京，1986

15) 中野昌康：Mφの産生する活性物質，日本臨床，47：526—533, 1989
16) Uchida A, Mizutani Y, Nagamuta M, et al: Effect of X-ray irradiation on natural killer (NK) cell system. 1. Elevation of sensitivity of tumor cells and lytic function of NK cells. Immunopharmacol Immunotoxicol 11: 507—519, 1989
17) 根住直史，小西淳二，御前　隆，他：In vitro X線照射によるNK活性の変動とOK-432によるNK活性増強作用について，日本医放会誌，45：752—763, 1985
18) 斉藤正好，尾形　均，三好武美，他：放射線全身照射による傷害リンパ球のNK活性および幼弱化機能の回復におよぼすチトクロームCの増強効果，基礎と臨床，19：355—359, 1985
19) Merluzzi VJ: Comparison of murine lymphokine-activated killer cells, natural killer cells, and cytotoxic T lymphocytes. Cellular Immunology 95: 95—104, 1985
20) Selvaraj RJ, Sbarra AJ: Effects of X-irradiation on the metabolic changes accompanying phagocytosis. Nature 210: 158—161, 1966