

マウスモデルを用いた自家骨髄移植における 移植細胞の抗腫瘍効果の *in vitro* での解析

佐藤 充重

近畿大学医学部第3内科学教室

Analysis of antitumor effects of grafts in autologous
bone marrow transplantation *in vitro*

Mitsushige Sato

Third Department of Internal Medicine, Kinki University School of Medicine,
Osaka, Japan

ABSTRACT

To clarify the interaction of splenocytes and grafts when grafts are trapped in the spleen after autologous bone marrow transplantation in cancer patients, experiments using mouse cells were conducted *in vitro*. Female DBA2/Cr mice aged 8 to 9 weeks and tumor cell lines L1210, P388D₁ and K562 were used. After L1210 cells and mouse splenocytes were cultured, mouse non-adherent bone marrow cells were added and culturing was continued. The resulting supernatant was separated from the culture broth (supernatant I). Using supernatant I, non-adherent bone marrow cells were cultured, and the resulting supernatant was collected (supernatant II). Factorial assay revealed that supernatant I contained interleukin-3 and interleukin-6. Each tumor cell line was cultured using supernatant II. Supernatant II was found to contain a species-specific tumor growth suppressor that significantly ($P < 0.001$) suppressed the growth of L1210 cells and P388D₁ cells in comparison with controls, but did not suppress the growth of K562 cells. It is inferred that a similar tumor growth suppressor is also produced when grafts are trapped in the spleen *in vivo*.

Key words : bone marrow transplantation, G₁ phase cell, IL-3, IL-6, anti-tumor effect.

緒 言

骨髄移植は、再生不良性貧血、白血病、重症免疫不全症などの根治的療法として欧米および本邦においても確立された治療法となり、その

臨床成績も目覚ましい成果が報告^{1,2,3}されている。しかし、同種骨髄移植においては、HLA identical donor が少なく、また移植後その予後を左右する急性および慢性の graft versus host disease (GVHD) の克服など、多くの問

題が残されている。骨髄移植においては、輸注された donor の骨髄細胞は recipient の脾臓に trap され、数日間脾臓内に留まった後、二次的に骨髄へ散布されると報告^{4,5} されている。しかし、この間に脾細胞と骨髄細胞にどのような相互作用が起こるのか、どのような因子が産生されるのか、などについての詳細な報告はない。最近 Stinner ら⁶ は、担癌マウスに自家骨髄移植を施行し、骨髄移植後に recipient マウスの血清中にコロニー刺激因子 colony stimulating factor (CSF) が認められ、この活性因子を投与することによって移植腫瘍が縮小することを報告した。本研究では、骨髄移植によって、移植細胞が抗腫瘍効果を示すための機序について解析を試みた。すなわち、in vitro でマウスの腫瘍細胞、脾細胞、骨髄細胞を混合培養し、CSF 産生の状態、CSF の性質、骨髄細胞培養後の CSF 活性による腫瘍細胞への影響などを検討した。

材 料

1. マウス：DBA2/Cr (静岡県実験動物農業協同組合で飼育) 雌、生後 8~9 週齢を使用し、オートクレーブ処理滅菌水、固形飼料 (CE-2, 日本クレア) を用いて水平層流の clean bench 内で飼育した。

2. 腫瘍細胞：DBA2/Cr マウスと同系のマウス腫瘍である L1210 細胞, P388D₁ 細胞, ヒト赤白血病細胞由来の K562 細胞の 3 種で、いずれも当教室で継代培養中のものを使用した。

3. 骨髄細胞：マウスをエーテル麻酔で屠殺後、大腿骨から flash out し、10% FCS 加 RPMI 1640 に浮遊させ、プラスチックシャーレに入れて付着細胞を除去し、非付着細胞 non adherent bone marrow cell (NABMC) を随時細胞数を調整して使用した。

4. 腫瘍細胞の移植：L1210 細胞を 10% FCS 加 RPMI 1640 に浮遊させ、 3×10^5 個を donor マウス背部に皮下移植した。

方 法

1. 担癌マウス脾細胞の骨髄細胞への影響の検討

L1210 細胞を移植後 96 時間でエーテル麻酔により、屠殺後脾臓を摘出し、細切後 10% FCS 加 RPMI 1640 に浮遊した。mitomycin C (MMC) で処理した脾細胞を、96 穴丸底 microplate (Costar Co. # 3799) を用いて 1×10^5 /well に調整し、NABMC を 1×10^5 /well 添加し 48 時間培養した。その後、³H-Thymidine (³H-TdR) 1 μ Ci を加え、さらに 12 時間培養後、³H-TdR の摂取率を液体シンチレーションカウンターで測定した。

2. L1210 細胞、脾細胞、NABMC の混合培養上清 (sup. I) の採取

正常マウスの脾細胞 1×10^6 /ml と MMC 処理 L1210 細胞 1×10^5 /ml を、10% FCS 加 RPMI 1640 に 2-mercapto-ethanol (5×10^{-5} M) を添加した培地を用いて 15 ml カルチャーチューブ (Corning Co. # 25319 LTF) に入れ、24 時間培養後、NABMC 1×10^6 /ml を添加し、さらに 48 時間培養して上清を採取し、これを sup. I とした。

3. sup. I の CSF 活性とコロニー形成数の測定

sup. I に含まれる CSF の測定は、Watson⁷ および Moore ら⁸ の方法に準じた。すなわち、sup. I を最終濃度 5% および 20% とし、96 穴丸底 microplate に NABMC を 1×10^5 /well 添加し、48 時間培養後 ³H-TdR 1 μ Ci を添加、さらに 12 時間培養後、骨髄細胞の ³H-TdR の摂取率を液体シンチレーションカウンターで測定した。そして骨髄細胞の活性度によって CSF 活性を測定した。また、コロニー形成数の検討は、軟寒天単層法を用いた。sup. I (最終濃度 10%)、granulocyte colony stimulating factor (G-CSF 三共から供与)、G-CSF + sup. I、GM-CSF 産生細胞である L 細胞上清、および L 細胞上清 + sup. I の 5 群に分け、7 日間培養後のコロニー形成数を測定し

た。

4. sup. I の IL-3 の測定

IL-3 dependent cell line である FDC-p2 細胞を、96穴平底 microplate (Falcon Co. # 3072) に 1×10^4 /well となるように調整して入れ、sup. I を2倍希釈法で添加し、42時間培養後 $^3\text{H-TdR } 1\mu\text{Ci}$ を加え、6時間後に $^3\text{H-TdR}$ 摂取率を液体シンチレーションカウンターで測定した。

5. sup. I の IL-6 の測定

IL-6 dependent cell line である HL-60 細胞をを、96穴平底 microplate に 1×10^4 /well となるように調整して入れ、sup. I を2倍、20倍、200倍希釈して添加し、42時間培養後 $^3\text{H-TdR } 1\mu\text{Ci}$ を加え、6時間後に $^3\text{H-TdR}$ 摂取率を液体シンチレーションカウンターで測定した。

6. sup. I と NABMC の培養後の上清因子(sup. II) の採取

NABMC を10% FCS 加 RPMI 1640 に浮遊し 2×10^6 /ml に調整後、sup. I を最終濃度20%添加し、15 ml カルチャーチューブで72時間培養後、上清を採取してこれを sup. II とした。

7. sup. II の腫瘍細胞 増殖に及ぼす影響の検討

L1210 細胞, P388D₁ 細胞, K562 細胞の各種

瘍細胞を、96穴平底 microplate を用いてそれぞれ 1×10^4 /well となるように加え、sup. II を2.5%, 5%, 10% (いずれも最終濃度) となるように添加し、42時間培養した。培養終了6時間前に $^3\text{H-TdR } 1\mu\text{Ci}$ を加え、 $^3\text{H-TdR}$ の摂取率によって各腫瘍細胞の増殖度を測定した。

8. 抗体で処理した sup. I と NABMC の培養上清が腫瘍細胞増殖に及ぼす影響の検討

sup. I に抗 IL-3 抗体 (Genzyme Co. Lot. No. BL 3M) (250 ng/ml) および抗 IL-6 抗体 (Genzyme Co. Lot. No. 716) (1,000 ng/ml) を添加後、37°Cで1時間インキュベートして、sup. I 中の IL-3, IL-6 を中和した。NABMC を 1×10^6 /ml に調整し、抗体処理 sup. I を最終濃度20%になるように添加し、15 ml カルチャーチューブで72時間培養後、上清を採取した。この上清を最終濃度10%となるように96穴平底 microplate に添加し、L1210 細胞, P388D₁ 細胞, K562 細胞を各々 1×10^4 /well となるように加え42時間培養した。培養終了6時間前に $^3\text{H-TdR } 1\mu\text{Ci}$ を加え、 $^3\text{H-TdR}$ の摂取率によって各腫瘍細胞の増殖度を測定した。

9. 統計処理 : Student's t 検定で行った。

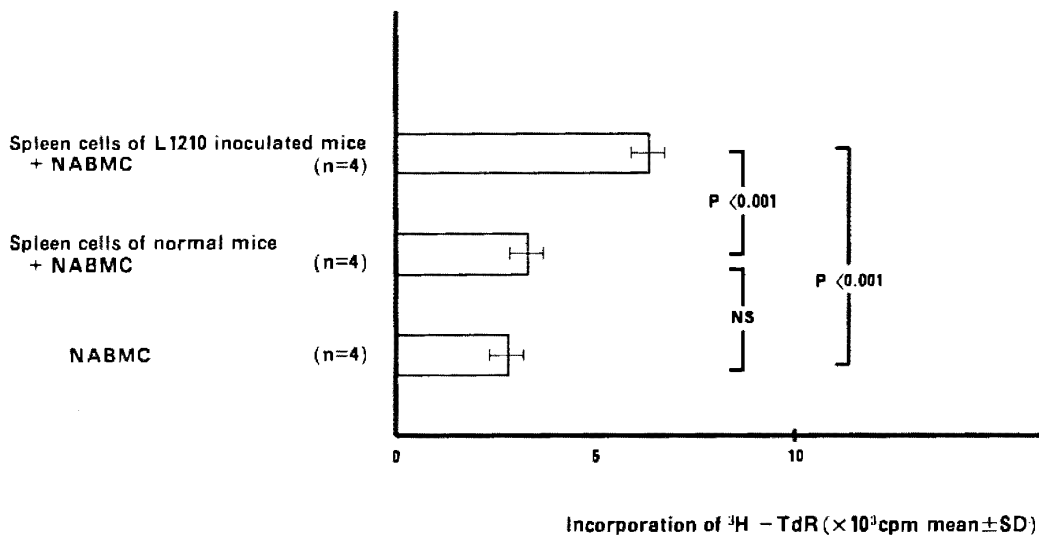


Fig. 1 Interaction between spleen cells of L1210 inoculated mice NABMC
Data shows the incorporation of $^3\text{H-TdR}$ of L1210 cells cultured with each supernatant collected from each combination of cells.

Table 1 CSF activity of sup. I

Cells	Incorporation of $^3\text{H-TdR}$ (cpm mean \pm SD)		
	5%	20%	Final concentration of sup. I
L1210+spleen cells+NABMC(n=4)	1976.3 \pm 167	3318.5 \pm 84.7	$P < 0.001$ $P < 0.001$ $P < 0.001$
L1210+spleen cells (n=4)	778.8 \pm 111.2	660.0 \pm 72.0	
Spleen cells+NABMC (n=4)	761.2 \pm 60.6	853 \pm 49.1	
Control (n=4)	682.6 \pm 90.3		

Each supernatant was collected from cultures of a combination of several cells control supernatant was collected from culturing only NABMC.

Data show' the incorporation of $^3\text{H-TdR}$ of NABMC by each supernatant.

結 果

1. 担癌マウス脾細胞の骨髓細胞への影響

担癌マウス脾細胞と正常マウス脾細胞が、NABMCにどのような影響を及ぼすかを比較検討した結果を Figure 1 に示した。正常マウス脾細胞と NABMC の培養群に比較し、担癌マウス脾細胞と NABMC の培養群では NABMC の $^3\text{H-TdR}$ 摂取率が有意 ($P < 0.001$) に高値を示した。

2. L1210 細胞, 脾細胞, NABMC の混合培養による sup. I 中の因子の検討

脾細胞の腫瘍抗原提示によって活性化された NABMC 中のリンパ球が、どのような因子を産生するか、またその因子によってさらに NABMC がどのような影響を受けるかを検討した。結果は Table 1 に示したように、L1210 細胞, 脾細胞, NABMC 3 種の混合培養上清は、L1210 細胞と脾細胞の培養上清、および脾細胞と NABMC の培養上清に比較し、いずれの最終濃度においても有意 (いずれも $P < 0.001$) に NABMC を活性化させる因子を含んでいた。またコロニー形成能を軟寒天単層法で検討した結果を、Table 2 に示した。sup. I の単独添加に比較して、G-CSF, L 細胞上清と sup. I の添加によって有意 ($P < 0.001$) にコロニー数が増加することが認められた。

3. sup. I 中の IL-3, IL-6 の測定

Table 2 Colony forming ability of sup. I

	n	colony numbers/ 2×10^5 cells
Sup. I	2	—
G-CSF	2	31.5
Sup. I + G-CSF	2	112
Sup. of L cell	2	41
Sup. I + sup. of L cell	2	162

Addition at 10% final concentration

造血幹細胞に対して early-active に作用する CSF として IL-3, IL-6 などが知られているので、IL-3 dependent cell line である FDC-P2, IL-6 dependent cell line である HL-60 の各細胞を用いて、sup. I 中に含まれている各 CSF を測定した。その結果は Figure 2 と Figure 3 に示したように、sup. I には IL-3 および IL-6 が含まれていることが明らかであった。

4. sup. I による NABMC 培養後の上清因子 (sup. II) の抗腫瘍活性の検討

IL-3, IL-6 を含む sup. I によって NABMC が活性化されることが示唆されたので、sup. I と共に培養した NABMC の L1210 細胞に対する抗腫瘍活性を検討した。すなわち、chromium⁵¹ releasing assay による結果では、sup. I で培養後の NABMC は L1210 細胞に対して傷害性を示さなかった (結果未掲載)。そこで培養後の sup. II を用いて L1210 細

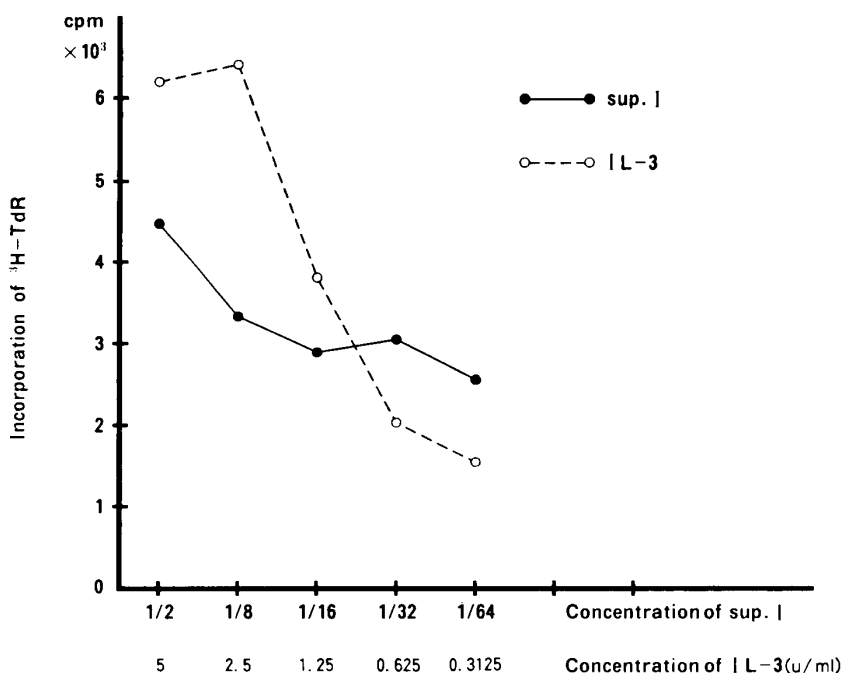


Fig. 2 IL-3 activity of sup. I (FDC-P2 cell used)
 IL-3(○··○) shows the incorporation of ³H-TdR of FDC-P2 cells cultured with IL-3.
 Sup. I (●—●) shows the incorporation of ³H-TdR of FDC-P2 cells cultured with sup. I.

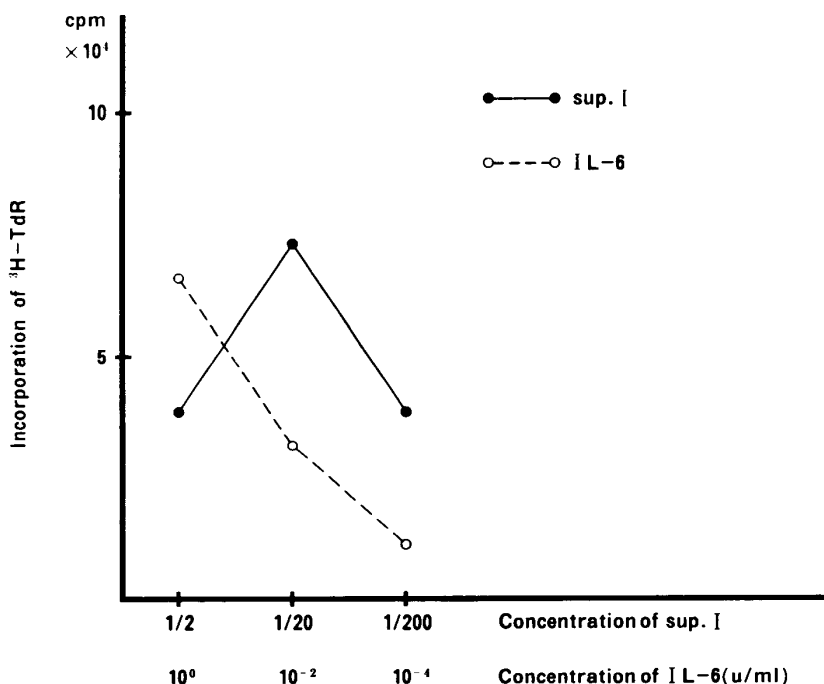


Fig. 3 IL-6 activity of sup. I (HL-60 cells used)
 IL-6 (○··○) shows the incorporation of ³H-TdR of HL-60 cells cultured with IL-6.
 Sup. I (●—●) shows the incorporation of ³H-TdR of HL-60 cells cultured with sup. I.

胞, P388D₁ 細胞, K562 細胞の各腫瘍細胞に対する増殖抑制作用を検討した。その結果は Figure 4, Figure 5, Figure 6 に示したように, sup. II の濃度が10%において L1210 細胞は対照群に比べて約52%, P388D₁ 細胞では

約26%増殖が抑制された。それに対して, K562 細胞では, 全く増殖抑制が認められなかった。次に sup. I を抗 IL-3 抗体, 抗 IL-6 抗体を用いて sup. I 中の IL-3, IL-6 を中和後, NABMC と培養後の上清を採取して, 各腫瘍

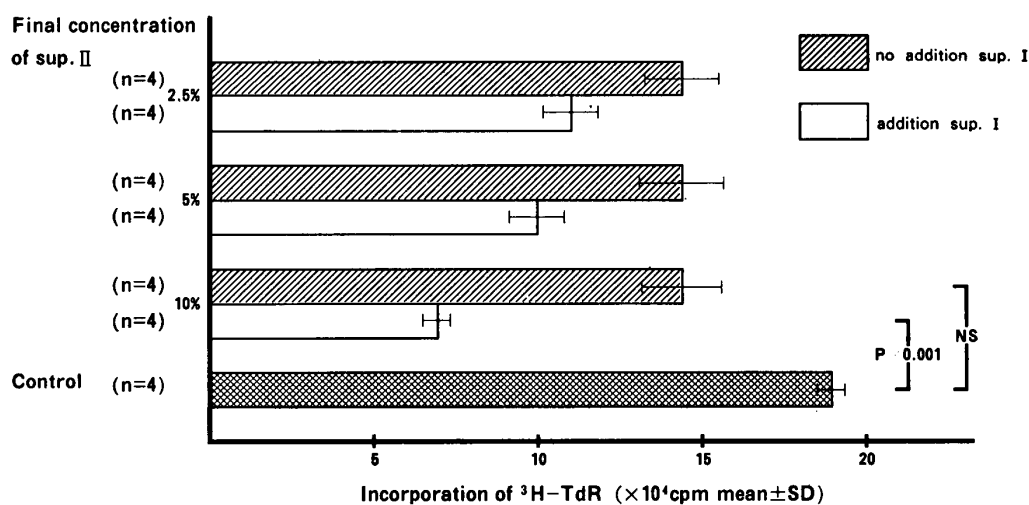


Fig. 4 Suppression of L1210 cells upon addition of sup. II
Supernatant II (□) was collected from culture with supernatant I and NABMC.
Supernatant II (▨) was collected from culture with only NABMC.
Data shows the incorporation of ³H-TdR of L1210 cells.

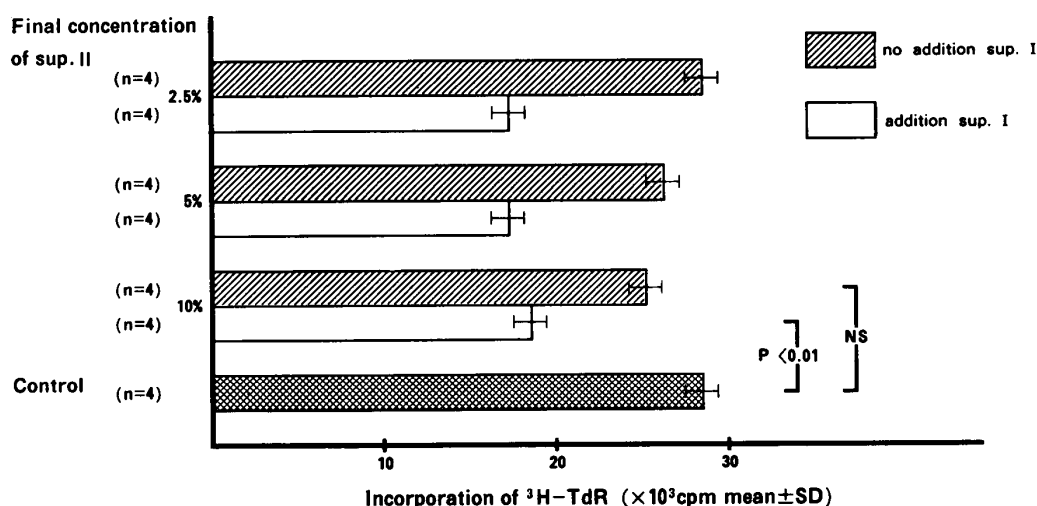


Fig. 5 Suppression of P388D₁ cells upon addition of sup. II
Supernatant II (□) was collected from culture with supernatant I and NABMC.
Supernatant II (▨) was collected from culture with only NABMC.
Data shows the incorporation of ³H-TdR of P388D₁ cells.

細胞の増殖抑制を検討した。その結果は、Figure 7, Figure 8, Figure 9 に示したように、抗体処理後の上清を用いて NABMC を培養しても腫瘍細胞の増殖は抑制されなかった。

考 察

造血器腫瘍、肺癌、小児神経腫瘍などに対する骨髄移植療法は、化学療法で完全寛解した初期に行うのが、もっとも成功率が高いといわれている。しかし、完全寛解初期には少数の腫瘍細胞が残存している例が多いことが、遺伝子の

解析によって明かにされている。一方、移植された donor の骨髄細胞が recipient の腫瘍細胞に対してどのような影響を与えているかについての報告はほとんどない。輸注された donor の骨髄細胞は、一度 recipient の脾臓に trap され、数日間脾臓内に留まった後、骨髄へ散布されると報告^{4,5} されている。骨髄細胞が脾臓内に trap されている間に、脾細胞と骨髄細胞の間に起こりうる相互作用、およびその作用によって産生される因子についての詳細な報告もまだない。Stinner ら⁶ は、担癌マウスに対

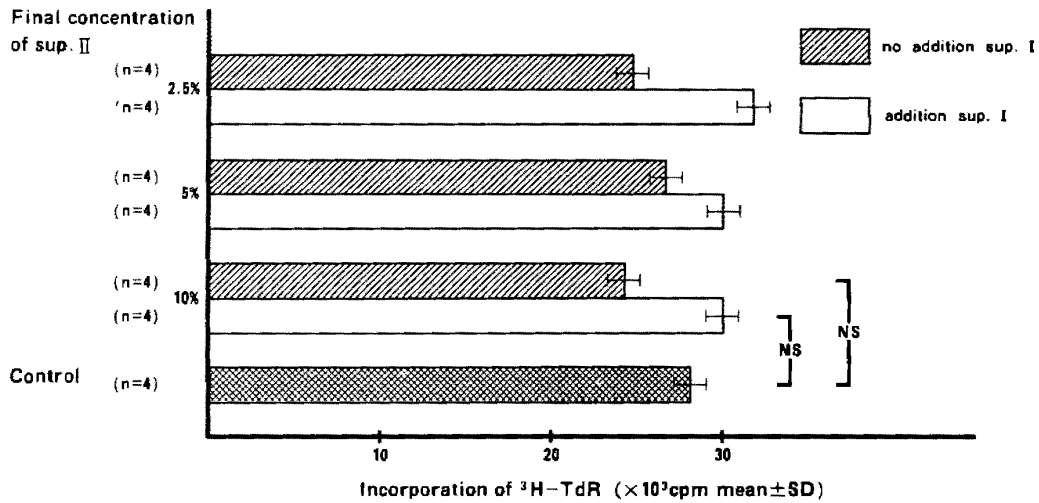


Fig. 6 Suppression of K562 cells upon addition of sup II
 Supernatant II (□) was collected from culture with supernatant I and NABMC.
 Supernatant II (▨) was collected from culture with only NABMC.
 Data shows the incorporation of ³H-TdR of K562 cells.

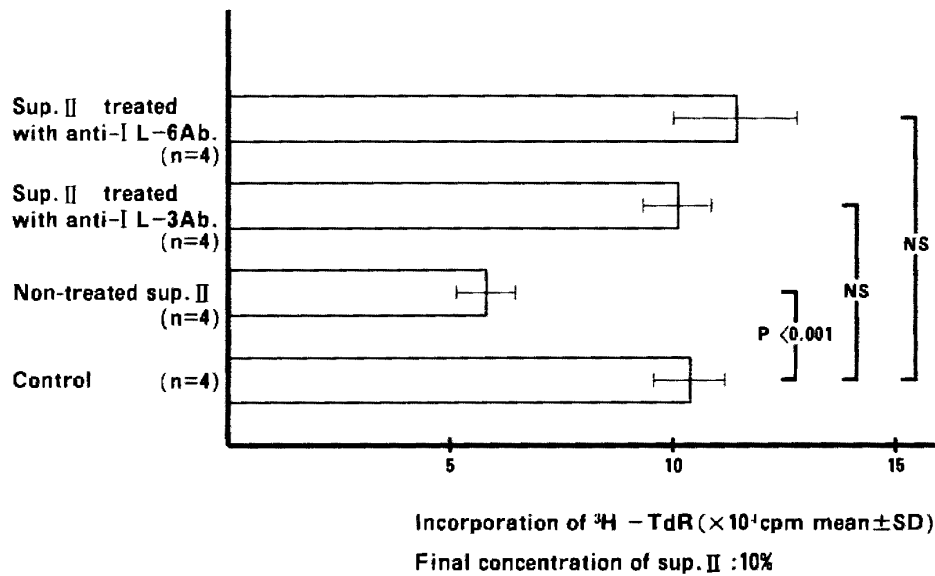


Fig. 7 Suppression of L1210 cells upon addition of sup. II treated with or without anti IL-3 antibody and anti IL-6 antibody
 Supernatant was collected from culture NABMC and supernatant I treated with or without anti IL-3 antibody and anti IL-6 antibody.
 Control is the culture of L1210 cells.
 Data shows the incorporation of ³H-TdR of L1210 cells cultured with supernatant.

して mild な化学療法後に自家骨髄移植を施行すると、移植後数時間で recipient マウスの血清中に CSF 活性が確認されたこと、この活性因子の投与によって移植腫瘍が縮小することを報告した。そこで本研究では、in vitro の系で、L1210 細胞、脾細胞、NABMC を混合培養し、上清中出现する因子の解析と、その因子による NABMC 培養後の上清の腫瘍細胞に対する影響について検討した。L1210 細胞移植後

のマウス脾細胞と NABMC の検討では、MMC 処理脾細胞によって NABMC が活性化されることを確認した。このことは、脾細胞が腫瘍細胞の可溶性抗原を認識して細胞表面上にこの抗原を提示し、NABMC との細胞間相互作用によって NABMC 中に含まれているリンパ球、とくに T 細胞が活性化される可能性が示唆された。藤原ら⁹ は、実験動物腫瘍の細胞表面上に存在する腫瘍関連抗原 (tumor-associated

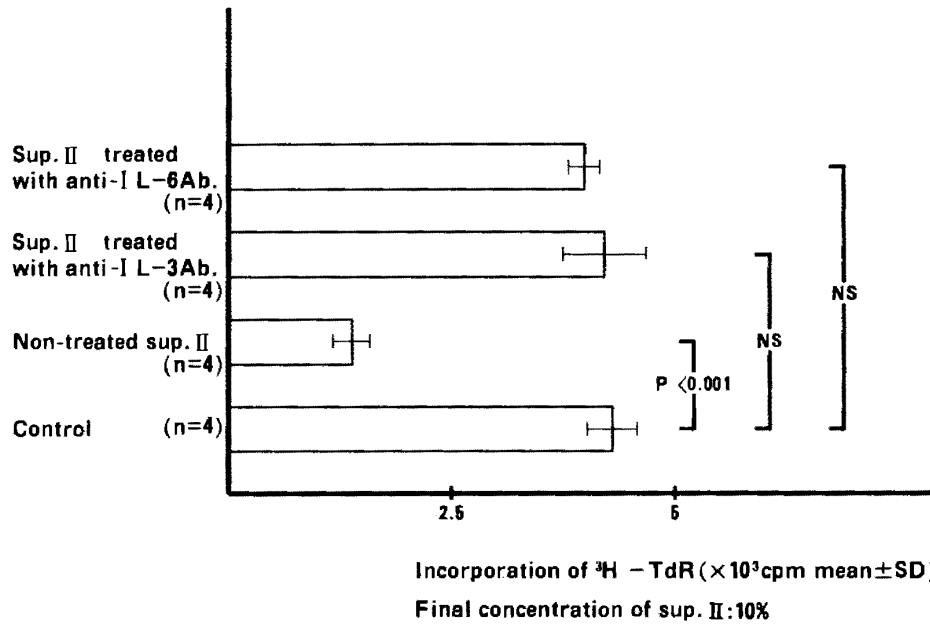


Fig. 8 Suppression of P388D₁ cells upon addition of sup. II treated with or without anti IL-3 antibody and anti IL-6 antibody
 Supernatant was collected from culture NABMC and supernatant I treated with or without anti IL-3 antibody and anti IL-6 antibody.
 Control is the culture of P388D₁ cells.
 Data shows the incorporation of ³H-TdR of P388D₁ cells cultured with supernatant.

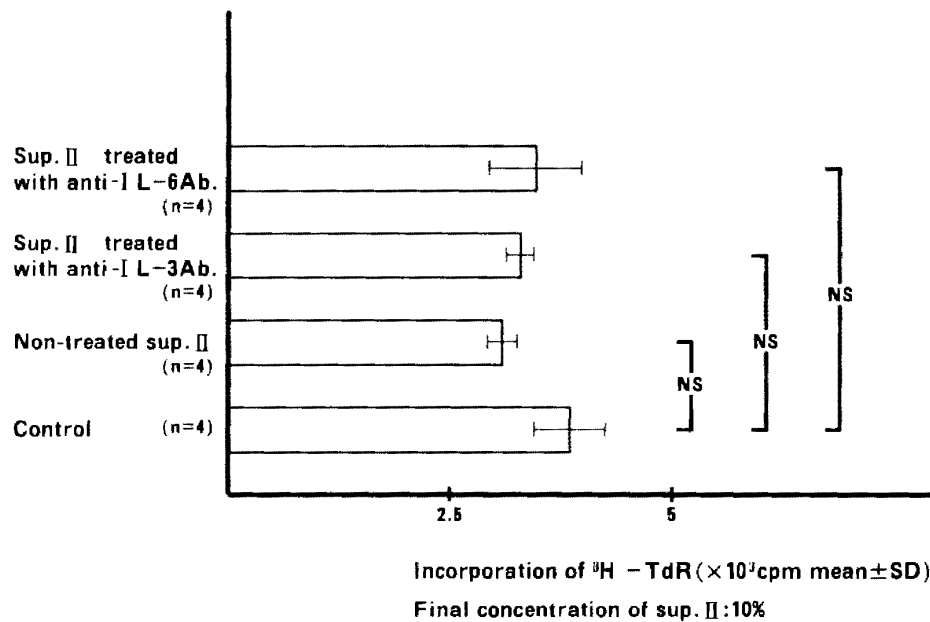


Fig. 9 Suppression of K562 cells upon addition of sup. II treated with or without anti IL-3 antibody and anti IL-6 antibody
 Supernatant was collected from culture NABMC and supernatant I treated with or without anti-IL-3 antibody and anti-IL-6 antibody.
 Control is the culture of K562 cells.
 Data shows the incorporation of ³H-TdR of K562 cells cultured with supernatant.

transplantation antigen: TATA) に対する宿主の免疫応答について報告している. それによると, TATA の宿主の認識様式は tumor-im-

munity-initiator T細胞 (L₃T₄; Lyt₂⁺) によって直接認識されるのではなく, 腫瘍表細胞面から TATA が脱落し, これを adherent 細

胞が pick up して細胞内で処理し, processed tumor antigens としてその表面上の MHC 抗原とともに T 細胞に抗原提示する. すなわち, class II MHC+腫瘍抗原は L_3T_4 T 細胞によって, また class I MHC+腫瘍抗原は Lyt_2 細胞によって認識され, この結果, T 細胞は活性化し種々の液性因子を産生するとしている. 一方, Kuntz¹⁰ や Opertz ら¹¹ は, 自己の non T 細胞 (B 細胞, マクロファージ) の Ia 抗原を認識することによって T 細胞が活性化されることを, autologous mixed lymphocyte reaction (AMLR) と定義している. 従って, adherent 細胞に提示された class II MHC+腫瘍抗原を認識し T 細胞が活性化する反応様式は, 一種の AMLR であると理解できる. 以上のことから, 担癌マウスに同系骨髄移植を行うと, 脾臓内で骨髄細胞が trap されている間に AMLR が起こっており, この反応によって活性化された T 細胞から CSF 様の因子が産生される可能性が考えられた. 近年, 活性化されたリンパ球から interleukin をはじめとする種々の cytokine が産生される報告が多いが, AMLR によって産生される cytokine については十分に解明されていない. Palacios¹² は AMLR で活性化された T 細胞から interleukin-2 が産生されると報告している. 今回の実験で, 担癌マウスの脾細胞によって NABMC が活性化されたことから, L1210 細胞, 脾細胞および NABMC の混合培養を行い, 上清中に含まれる因子について検討した. その結果, 上清中には骨髄細胞の DNA 合成を促進させるがコロニー形成能は強くなく, G-CSF や L 細胞上清の添加によってコロニー数を増加させるような CSF 様因子が存在することが証明された. CSF 活性作用を有する cytokine として GM-CSF (L 細胞上清), G-CSF, M-CSF, IL-3, IL-6 などが知られているが, GM-CSF, G-CSF, M-CSF は各々単独に添加してもコロニー形成能をもっている. sup. I に認められた CSF 様因子は, GM-CSF, G-CSF, M-CSF ではなく, 造血幹細胞の分化成熟の初期過程, つまり

G_0 期あるいは G_1 期の幹細胞に強力な作用を示す因子であることから, IL-3 あるいは IL-6 の可能性が示唆された. そこで IL-3 dependent cell line の FDC-P2 および IL-6 dependent cell line の HL-60 を用いて検討したところ, sup. I 中に含まれている CSF 様因子は IL-3 と IL-6 であることが確認された. 以上のことから, 担癌マウスに同系骨髄を移植後, 骨髄細胞が recipient マウスの脾臓内に trap されている間に, 脾細胞 (adherent 細胞) と AMLR を起こし, それによって IL-3 と IL-6 の CSF が産生されると考えられた. IL-2 の産生については検討していないが, その可能性は否定できなかった.

すでに述べたような Stinner ら⁶ の報告の他に, 井上ら¹³ は, sizofilan をマウスに投与すると血清中の CSF 活性が上昇すること, さらに CSF 活性が上昇した血清を用いて骨髄細胞を培養すると, 骨髄細胞による腫瘍傷害活性が誘導されることを報告している. このように CSF を用いて骨髄細胞を活性化すると, 腫瘍の成長を抑制する因子, あるいは抑制細胞が誘導されることは明らかである. そこで本研究では, L1210 細胞, 脾細胞および NABMC の混合培養によって採取した sup. I を用いて, *in vitro* で, 腫瘍細胞の傷害活性を検討した. すなわち, IL-3, IL-6 の lymphokine を含む sup. I で骨髄細胞を培養し, その上清 (sup. II) と培養細胞の各々について腫瘍細胞への影響を観察したところ, 培養細胞の腫瘍細胞への影響は全く認められなかった. そこで, L1210 細胞, P388D₁ 細胞, K562 細胞の各腫瘍細胞の培養系に sup. II を添加して培養したところ, L1210 細胞と P388D₁ 細胞はコントロールに比べてそれぞれ約 52%, 約 26% に増殖抑制が認められた. しかし, K562 細胞の増殖は抑制されなかった. また, sup. II は各腫瘍細胞に対して傷害性は認められなかった. このことから, sup. I に含まれている IL-3 と IL-6 が骨髄細胞に作用して, 腫瘍増殖抑制因子を産生している可能性が示唆された. これを証明する

ため sup. I に抗 IL-3 抗体および抗 IL-6 抗体を加えて IL-3 と IL-6 を中和した後に骨髓細胞を培養し、その上清を L1210 細胞, P388 D₁ 細胞, K562 細胞の各培養系に添加したところ、いずれの腫瘍細胞も増殖抑制が認められなかった。最近、IL-3 および IL-6 の骨髓造血幹細胞に及ぼす影響に関する報告がみられるようになった。Ikebuchi ら¹⁴ は、IL-6 が静止期幹細胞を賦活化させ G₀ 期の期間を短縮させる作用があると報告している。また Koike ら¹⁵ は、IL-6 が造血幹細胞に作用して細胞上の IL-3 に対する receptor 数を増加させること、あるいは IL-3 に対する親和性を高めることによって造血幹細胞の IL-3 に対する感受性を亢進させる作用があることを報告している。一方、cytokine が細胞に作用して腫瘍骨髓細胞抑制因子の産生を促す報告は少ない。緒方ら¹⁶ は、wheatgerm agglutinin 陽性の G₁ 期にある幹細胞に IL-3 が作用すると、強力な免疫抑制活性が得られると同時に、腫瘍細胞の増殖を抑制する液性因子が分泌されると述べている。本研究の結果では、IL-3 と IL-6 の相乗作用によって骨髓細胞から L1210 細胞および P388 D₁ 細胞の増殖を抑制し、K562 細胞の増殖は抑制しない種特異的な腫瘍増殖抑制因子の産生が示された。このことは、IL-6 が G₀ 期幹細胞に作用して、早期に G₁ 期幹細胞へ導入し、同時に IL-3 に対する感受性を高め、その後に IL-3 の作用によって G₁ 期幹細胞から腫瘍増殖抑制因子が産生されると考えられた。in vivo においても、担癌マウスに骨髓細胞を移植すると、その脾臓内に骨髓細胞が trap されている間に AMLR によって IL-3 および IL-6 が産生され、同時に IL-3 と IL-6 の作用によって骨髓細胞、とくにその中の wheatgerm agglutinin 陽性 G₁ 期細胞から腫瘍増殖抑制因子が産生される可能性が示唆された。このことは、同時にヒト悪性腫瘍に対する骨髓移植療法が効果を示す一因としても考えられた。なお、本研究では、腫瘍増殖抑制因子の生化学的な性質については究明できなかったが、今後の重要

な検討課題と考えている。

謝 辞

稿を終えるにあたりご指導、ご校閲を賜りました堀内篤教授に深甚なる謝意を表します。また直接ご指導頂きました椿和央講師ならびに IL-6 を測定して頂きました皮膚科学教室の山田秀和先生に深謝致します。

本研究は文部省科学研究費（一般研究63570305）の援助をうけた。

文 献

1. Gale RP, Chaplin. Bone marrow transplantation in leukemia: critical analysis and controlled clinical trials. In: Gale RP, Alan R. Recent advances in bone marrow transplantation: New York: Liss INC, 1983; 71-94.
2. Botin MM, Gale RP, Rimm AA. Allogeneic bone marrow transplantation for 144 patients with severe aplastic anemia. JAMA 1981; 1132-1139.
3. 正岡 徹. 骨髓移植を用いた悪性腫の根治療法に関する研究. 井上俊彦編・厚生省がん特別研究骨髓移植を用いた悪性腫瘍の根治療法に関する研究. 班登録集計報告書. 東京: 厚生省, 1987; 52-56.
4. Goldman JM, Johnson SA, Islam A, Catovsky D, Galton DAG. Hematological reconstitution autografting for chronic granulocytic leukemia in transformation: the influence of previous splenectomy. Br. J. Haematol 1980; 45: 223-231.
5. Rappaport J, Parkman R, Belli J, Levey R, Rosen F, Nathan D. Reversibility of myelofibrosis (MF) after bone marrow transplantation. Blood 1978; 52, (Suppl 1): 271.
6. Stinner G, Souverein M, Dettmer D. Graft versus tumor: models for autologous bone marrow transplantation in murine tumor systems. In: McVie JG, Dalesio O, Smith IE, eds. Autologous bone marrow transplantation and tumor: New York: Raven Press, 1984; 49-75.
7. Watson JD. Biology and biochemistry of T cell-derived lymphokines: the coordinate synthesis of interleukin 2 and colony-stimulating factors in a murine T cell lymphoma. J Immunol 1983; 131: 293-297.
8. Moore RN, Rouse BT. Enhanced responsiveness of committed macrophage precursors to macrophagetype colony-stimulating factor (CSF

- 1) induced in vitro by interferons $\alpha + \beta^1$. *J Immunol* 1983 ; 131 : 2374-2378.
9. 藤原大美, 浜岡利之. 腫瘍特異的T細胞の腫瘍抗原認識および効果発見機構. *日臨免誌* 1988 ; 11 : 518-521.
10. Kuntz MM, Innes JB, Weksler ME. Lymphocyte transformation induced by autologous cells : IV. human T-lymphocyte proliferation induced by autologous or allogeneic non-T lymphocytes. *J Exp Med* 1976 ; 143 : 1042-1053.
11. Opelz G, Kikuchi M, Takasugi M, Terasaki PI. Autologous stimulation of human lymphocyte subpopulations. *J Exp Med* 1975 ; 142 : 1327-1337.
12. Palacios R, Moller G. HLA-DR antigens render resting T cells sensitive to interleukin-2 and induce production of the growth factor in autologous mixed lymphocyte reaction. *Cell Immunol* 1981 ; 63 : 143-153.
13. 井上 守, 奥野 正, 伊藤 清, 山本正春, 土屋吉則, 熊谷勝男. シゾフィラン投与血清による骨髄細胞の増殖と腫瘍障害活性の誘導. *医学のあゆみ* 1986 ; 139 : 415-416.
14. Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y, Ogawa M. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci* 1987 ; 84 : 9035-9039.
15. Koike K, Nakahata T, Takagi M, et al. Synergism of BSF-2/interleukin 6 and interleukin 3 on development of multipotential hemopoietic progenitors in serum free culture. *Proc Natl Acad Sci* 1988 ; 85 : 4824-4826.
16. 緒方 肇, 杉浦喜久弥, 稲葉宗矢, 安永良知, 大西陽子, 池原 進. 骨髄中の免疫抑制細胞 (Natural suppressor cell) の精製及びその Characterization. *日免会誌* 1987 ; 17 : 261.