

Phenotypic Characterization of LAK (Lymphokine-Activated Killer) Cells Inducible in Severe Combined Immunodeficiency and Nude Mice

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8027

重症複合免疫不全マウスおよびヌードマウスにおける LAK (lymphokine-activated killer) 細胞の 誘導と LAK 前駆細胞の性状

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

蓮 井 正 樹

(昭和63年2月23日受付)

インターロイキン2 (interleukin 2, IL-2) によって誘導されるリンホカイン活性化キラー (lymphokine activated killer, LAK) 細胞は種々の新鮮腫瘍細胞や培養腫瘍細胞に対して細胞障害性に働き、ナチュラル・キラー (natural killer, NK) 細胞とならび生体における腫瘍監視機構としての役割が注目されているが、その由来およびNK細胞との異同については不明な点が多い。本研究ではT、B細胞を欠損するため細胞性および液性免疫不全を主徴とし、遺伝学的に常染色体劣性遺伝形式をとる重症複合免疫不全 (severe combined immunodeficiency, SCID) を呈する CB-17 scid/scid (SCID) マウスおよびT細胞を欠如する BALB/c nu/nu (Nude) マウスの脾細胞を用いてNK細胞とLAK細胞の関係について検討した。NK感受性細胞株であるYAC-1を標的細胞として測定したNK細胞活性はSCIDマウスにおいて、対照のCB-17 +/+ (CB-17) マウスと同様にみられ、SCIDマウスのNK細胞は正常に存在するものと考えられた。その表面マーカーはT細胞形質であるLyt-1, Lyt-2, L3T4を有さず、Thy-1⁻. asialo GM₁⁺ (aGM₁⁺) であった。LAK活性はヒト組換えIL-2 (500 U/ml) 存在下で3日間培養し、NK抵抗性細胞株でマウス肥満細胞腫由来のP815を標的細胞として測定したが、SCIDおよびNudeマウスからもCB-17マウスと同程度のLAK活性が誘導された。LAKフェクター細胞を抗体-補体処理およびPanning法により検討したところSCIDおよびCB-17マウスともThy-1⁺. aGM₁⁺細胞であった。特に培養後もSCIDマウスではLyt-1, Lyt-2, L3T4および表面免疫グロブリンは発現せず、LAKエフェクター細胞はNK細胞が主体をなすと思われた。LAK前駆細胞を抗aGM₁血清 *in vivo* 投与により検討するとCB-17マウスのLAK細胞活性はほぼ消失したが、SCIDおよびNudeマウスのLAK細胞活性はaGM₁⁻細胞群からも誘導された。このことはCB-17マウスではLAK前駆細胞が脾細胞中のaGM₁⁺細胞に含まれるのに対して、SCIDマウスではLAK細胞活性の多くがaGM₁をもたない、より幼若と考えられる細胞群より誘導されることを示す。しかし、SCIDおよびNudeマウスでは培養後Thy-1⁺. aGM₁⁺細胞の出現がみられたことからこのaGM₁⁻細胞群はNK前駆細胞であると考えられ、T、B細胞を欠くSCIDやT細胞を欠くNudeマウスの脾臓では正常マウスと異なりIL-2反応性で、より幼若なaGM₁⁻のNK前駆細胞プールが異常に大きいことが示唆された。

Key words Lymphokine-activated killer, natural killer, nude mice, mice with severe combined immunodeficiency

Abbreviations: aGM₁, asialo GM₁; C', complement; Con-A, concanavalin A; CM, complete medium; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; E/T ratio, effector to target ratio; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; ³H-TdR, tritiated thymidine; IL-2, interleukin 2; LAK, lymphokine-activated killer; Ig,

ナチュラル・キラー (natural killer, NK) 細胞は抗原認識を介さず細胞障害活性をもつ細胞であり、腫瘍免疫やウイルス感染防御機構の一翼を担っている¹⁰⁾。また、形態的には細胞質内に大顆粒をもつため大顆粒リンパ球 (large granular lymphocyte, LGL)¹¹⁾とも称されている。この NK 細胞の起源に関しては以前より遺伝子レベルを含めてさまざまな解析がなされており、現在のところ non-T, non-B の独立した細胞と考えられている¹²⁾。一方、Grimm ら¹³⁾によって提唱されたリンホカイン活性化キラー (lymphokine-activated killer, LAK) 細胞とはインターロイキン 2 (interleukin 2, IL-2) の存在下で 3~5 日間培養することにより新鮮腫瘍細胞や NK 抵抗性の各種腫瘍細胞株に対しても障害活性をもつ細胞で、その細胞の由来および NK 細胞との異同については議論の多いところである⁷⁻¹⁰⁾。

ところで、Bosma ら¹⁴⁾は重症複合免疫不全 (severe combined immunodeficiency, SCID) を呈するマウスを見出した。このマウスは CB-17 純系マウスから派生した突然変異マウスであり、scid 遺伝子は第16番目の染色体上にあって常染色体劣性遺伝の形¹⁵⁾をとる。この CB-17 scid/scid (SCID) は T, B 細胞を欠如し、免疫グロブリン産生がみられないが^{16,17)}、myeloid 系は正常であり¹⁸⁾、ヒトにおける SCID の病態を解明するモデルマウスとして注目されている。一方、NK 活性は保持されていることが報告されており¹⁹⁾、このマウスを用いて NK 細胞と LAK 細胞の相互関係を検討することは T, B 両細胞の影響を除外して考えることができるため、有用な系をなすと思われる。

今回、T, B 細胞を欠く SCID マウス、加えて T 細胞を欠く Nude マウスを用いて LAK エフェクター細胞および LAK 前駆細胞の性状ならびに NK 細胞との関係について正常マウスと比較、検討した。

材料および方法

I. マウス

Bosma 博士 (The Institute for Cancer Research, Philadelphia, PA) から供与された CB-17 +/+ (CB-17) および、CB-17 +/scid を交配させて CB-17 scid/scid (SCID) を得た。これらのマウスは金沢大学動物実験施設のアイソレーションケージに

で無菌に飼育し 6~16 週齢のものを使用した。また、BALB/c nu/nu (Nude) は静岡県動物実験農業協同組合から購入し、8 週齢のものを使用した。SCID マウスの同定は血清免疫グロブリン (immunoglobulin, Ig) 値で決定した。

II. 血清 Ig 測定

血清 Ig は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によって測定した。まず pH 9.6 の 0.02% アジ化ナトリウム含有 0.05 M 炭酸緩衝液で、ヤギ抗マウス免疫グロブリン (IgG+IgA+IgM) 抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD) を 1/2000 希釈し、E. I. A. 用 96 穴平底マイクロタイテーションプレート (Flow laboratories Inc., McLean, VA) に 0.15ml ずつ加えて室温で 2 時間コーティングした。ついで、0.02% アジ化ナトリウム含有リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline with sodium azide, PBSA) に 0.05% Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO) を加えた PBSA-Tween で 3 回洗浄し、1% 非動化牛胎児血清 (heat-inactivated fetal bovine serum, FBS) (GIBCO, Grand Island, NY) 加 PBSA-Tween で段階希釈したマウス被検血清を 0.1ml ずつ加えて、2 時間室温で反応させた。反応終了後、PBSA-Tween で 3 回洗浄し、さらに 1% FBS 加 PBSA-Tween で 1/200 希釈したフォスファターゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン (IgG+IgA+IgM) 抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) を 0.1ml ずつ加えて 2 時間室温で反応させた。その後、PBSA-Tween で 3 回洗浄し、最後に pH 9.8 のジエタノールアミン緩衝液で p-nitrophenyl phosphate (Sigma) を 1mg/ml に調整し、0.1ml ずつ加えて室温で 8~12 時間発色反応させた。呈色反応は吸光度計 EAR 400 (Slt-labinstruments, Austria) により波長 492nm で測定し、既知濃度の標準血清 (マウス IgG 抗体) (Sigma) を用いてマウス被検血清の Ig 値を算出した。

III. 脾細胞の分離

マウスをジエチル・エーテル麻醉下で頸椎脱臼させて屠殺し、脾臓を採取した。この脾臓を無菌下にステンレスメッシュ上で細切濾過し以下に記す complete medium (CM) にて二回洗浄後再浮遊した。CM はペニシリン (200 U/ml), ゲンタマイシン (10 μg/ml), 0.02 M Hepes 緩衝液 (GIBCO, Grand

immunoglobulin; LGL, large granular lymphocyte; NK, natural killer; PBSA, phosphate buffered saline with sodium azide; PHA, phytohemagglutinin; PWM, pokeweed mitogen; SCID, severe combined immunodeficiency; UF, unfraction.

Island, NY), 50 μ M 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol, 2-ME), 10% FBS を含む RPMI 1640 (GIBCO) 培養液を用いた。

IV. LGL の算定

脾細胞のスライド標本は Cytospin 2 (SHANDON, England) を用いて作成した。冷風乾燥後 May-Grünwald-Giemsa 二重染色を行い、鏡検上 250-500 個の細胞をカウントして LGL の比率を百分率で求めた。

V. 脾細胞表面マーカーの検索

脾細胞を下記に示すフルオレセイン・イソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗体を用いた直接および間接免疫蛍光法で解析した。直接免疫蛍光法は FITC 標識抗 Thy-1.2, 抗 Lyt-1, 抗 Lyt-2 抗体 (以上 Becton-Dickinson, Mountain View, CA) および FITC 標識ヒツジ抗マウス Ig 抗体 (Janssen, Beerse, Belgium) を用いた。間接免疫蛍光抗体法は一次抗体として抗 L3T4 抗体 (Becton-Dickinson) および抗 asialo-GM₁ (aGM₁) 血清 (和光純薬, 大阪) を用い、二次抗体に各々 FITC 標識ヒツジ抗ラット IgG 抗体および FITC 標識ヒツジ抗ウサギ (IgG+IgA+IgM) 抗体 (以上 Cooper Biomedical Inc., Malvern, PA) を用いた。解析はレーザーフローサイトメーター, スペクトラム III (Ortho Diagnostic Systems Inc., Westwood, MA) を使用した。

VI. マイトーゲンおよび IL-2 に対する反応

2.5 $\times 10^6$ /ml の脾細胞を 96 穴平底マイクロプレート (Corning Glass Works, Corning, NY) に 0.2ml ずつ分注し、フィトヘマグルチニン (phytohemagglutinin-P, PHA-P, 0.2% vol/vol) (DIFCO, Detroit, MI), コンカナバリン A (Concanavalin A, Con-A, 25 μ g/ml) (DIFCO), ポークウィードマイトーゲン (pokeweed mitogen, PWM, 10 μ g/ml) (DIFCO), ヒト組換え IL-2 (recombinant IL-2, rIL-2) (塩野義, 大阪) (500 U/ml) を添加し、72 時間または 96 時間培養した。培養終了 24 時間前に ³H 標識チミジン (tritiated thymidine, ³H-TdR) (New England Nuclear, Boston, MA) を 0.2 μ Ci 添加し、液体シンチレーションカウンター LPS-700 (アロカ, 東京) にて ³H-TdR の取込みを測定した。

VII. polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) の投与

NK 活性を増強させる目的でインターフェロン誘導剤である poly I:C²⁰ (Sigma) を 100 μ g マウス腹腔内に投与し、その翌日に脾細胞を取り出し NK 活

性を測定した。

VIII. LAK 細胞の誘導

5 $\times 10^6$ /ml の脾細胞を 6 穴あるいは 24 穴培養プレート (Falcon 3046, 3047, Becton Dickinson and Co., Lincoln Park, NJ) 上に浮遊し、IL-2 を各種濃度 (50-2500 U/ml) で添加し、炭酸ガス培養器 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 内にて 1-5 日間培養した。LAK エフェクター細胞としては、培養終了後 CM で一回洗浄し、5 $\times 10^6$ /ml に再調節して使用した。

IX. NK 活性および LAK 活性の測定

NK 活性は標的細胞としてマウスリンパ腫由来の細胞株である YAC-1 を、LAK 活性はマウス肥満細胞腫由来で NK 抵抗性細胞株である P815 を用い、⁵¹Cr-release assay にて測定した。即ち各標的細胞を Na₂⁵¹CrO₄ (New England Nuclear) でラベルした後、CM で 5 $\times 10^4$ /ml に調節し種々の濃度のエフェクター細胞 (0.1ml) のはいった 96 穴丸底マイクロプレート (Corning Glass Works) に 0.1ml ずつ分注し、25 \times G, 5 分間遠心後 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 下で 4 時間培養し、ハーベスティングフレーム (Skatron, Norway) に吸収された上清中の ⁵¹Cr 放出量をガンマシンチレーションカウンター ARC-501 (アロカ) で測定した。% cytotoxicity は以下の式で算出した。

$$\% \text{ cytotoxicity } (\%) = \frac{\{[(\text{experimental release}) - (\text{spontaneous release})] / \{(\text{maximum release}) - (\text{spontaneous release})\}\} \times 100}$$

maximum release は 1% トリトン X 0.1ml を標的細胞 0.1ml に添加した時の ⁵¹Cr 最大放出量を示し spontaneous release は CM 0.1ml を添加した時の ⁵¹Cr 自然放出量を示す。

また、lytic unit (LU) は回帰直線を用いて算出した。なお、10⁶個の脾細胞が 20% の細胞障害活性をもつ場合を 1 LU とした。

X. 抗体-補体処理

1 \sim 2 $\times 10^7$ /ml の脾細胞に 1/100 希釈の抗 Thy-1.2 抗体, 抗 Lyt-2 抗体, 抗 aGM₁ 血清を加えて 4 $^{\circ}$ C 下で 40 分間反応させ、その後一回洗浄しさらに 1/10 希釈の低毒性ウサギ補体 (Cedarlane, Canada) を加えて、37 $^{\circ}$ C 下で 40 分間反応させた。反応終了後二回洗浄し CM に再浮遊した。

XI. Panning 法

Wysocki ら²⁰の方法に準じて行った。まず、ヒツジ抗ウサギ (IgG+IgA+IgM) 抗体 (Cooper Bio-

medical Inc.) を pH 9.5の0.05Mトリス緩衝液で1/10希釈し、プラスチックディッシュ (Falcon 3002, Becton Dickinson) に撒布して4°C下で2時間コーティングした。ついで冷却PBSで3回洗浄し、あらかじめ抗 aGM₁ 血清と反応させておいた5×10⁶/mlの脾細胞をプラスチックディッシュに静かに加えて4°C下で2時間反応させた。反応後の非付着細胞を aGM₁ 陰性細胞 (aGM₁⁻)、付着細胞を aGM₁ 陽性細胞 (aGM₁⁺)、プラスチックディッシュに加える前の細胞を非分画細胞 (unfraction, UF) とした。

Ⅷ. 抗 aGM₁ 血清の in vivo 投与

抗 aGM₁ 血清30μlをPBSに希釈してマウス尾静脈より3日間連続静注し、その翌日に脾臓を採取し、使用した。

成 績

I. SCID マウスの同定

血清 Ig は CB-17 マウスが900±500μg/mlであるのに対し、SCID マウスではほとんどが10μg/ml以下であった(図1)。しかし、SCID マウスの約15%に低レベルのIgをみることが知られており¹⁹⁾、この場合脾細胞にも一部成熟したT細胞が存在するとされている²⁰⁾。よって以降の実験では血清Igが2μg/ml以下のものをSCIDとして使用した。なお、CB-17 +/scid マウスの血清IgはCB-17マウスのIgと同程度だった。

II. SCID マウス脾細胞の性状

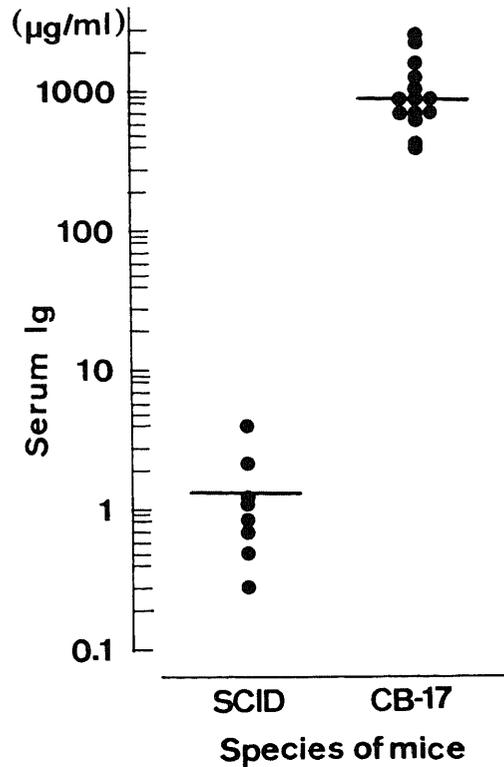


Fig. 1. Serum immunoglobulin levels. Total serum Ig levels were determined by ELISA assay

Table 1. Spleen size, recovered cell numbers, and percent distribution of LGL in CB-17 and SCID mice

mice	weight(mg)	size(mm)	cells(×10 ⁷)	% LGL
CB-17 (n=10) ^{a)}	84-95	5-7×15-18	5.0-10.0	0.6±0.6 ^{b)}
SCID (n=5)	52-73	4-5×12-13	0.5-1.5	2.9±0.8

^{a)} number of mice
^{b)} mean±S.D.

Table 2. Cell surface phenotypes of fresh splenocytes

mice		% positive cells ^{a)}					
		Thy-1	Lyt-1	Lyt-2	L3T4	s-Ig	aGM ₁
CB-17	(n=10) ^{b)}	35.3±3.4 ^{c)}	31.3±4.1	9.1±3.1	22.3±3.6	61.9±4.7	9.6±3.6
SCID	(n=5)	10.7±3.4	0.4±0.3	0.8±0.2	0.6±0.2	0.8±0.5	28.3±5.7
Nude	(n=5)	5.2±1.6	0.9±0.1	0.7±0.2	0.8±0.2	75.9±5.0	20.3±6.1

^{a)} Positive cells were evaluated by immunofluorescence using flow cytometry
^{b)} number of mice
^{c)} mean±S.D.

SCID マウスの脾は CB-17 マウスと比べて大きさ、重量ともに小さく、回収細胞数を比較しても 1/5~1/10 と少ないが、逆に LGL の比率は高かった (表 1)。これは全細胞数が少ないためのみかけ上のものであり、絶対数はほぼ同じであると考えられた。

脾細胞の表面マーカー検索において、Lyt-1²⁶¹ (pan T 細胞を認識し、ヒトの CD5 に相当)、Lyt-2²⁶¹ (キラー/サブプレッサー細胞を認識し、CD8 に相当) および、L3T4²⁷¹ (ヘルパー/インデューサー細胞を認識し、CD4 に相当) 陽性細胞はいずれも 1% 以下であり、表面免疫グロブリン (surface Ig, s-Ig) を発現している細胞もなかった (表 2)。一方、NK 細胞の表面マーカーである aGM1²⁸¹ を発現する細胞は 28.3±

5.7% と高率にみられた。なお、T 細胞と NK 細胞の一部にみられる Thy-1 陽性細胞^{29,30)} は SCID マウスで 10.7±3.4%、Nude マウスで 5.2±1.6% みられたが、両者ともフローサイトメーター上蛍光強度は CB-17 マウスの場合と比べて弱かった。

マイトージェンに対する反応において、SCID 脾細胞は PHA, Con-A, PWM いずれにも反応しなかったが、IL-2 に対しては著明な ³H-TdR の取込みがみられた (表 3)。

III. NK 活性および NK 細胞の性状

CB-17, SCID マウス脾細胞ともに内因性 NK 活性は高くないが、poly I:C 投与により両者とも増強された (表 4)。一方、NK 抵抗性細胞株である P815

Table 3. Proliferative responses of splenocytes from CB-17 and SCID mice to mitogens and IL-2

mice	³ H-TdR incorporation			
	medium	PHA	Con-A	IL-2
CB-17	368±199 ^{a)}	25037±1330	70204±8892	4255±796
SCID	787±105	577±277	1035±146	11531±1306

mice	³ H-TdR incorporation		
	medium	PWM	IL-2
CB-17	1673±259	15348±1487	9325±1144
SCID	715±44	786±125	12617±285

Splenocytes (5×10⁵ cells) were cultured for 3(A) or 5(B) days in microculture plates with medium alone, PHA (0.2% vol/vol), Con-A (25μg/ml), PWM (10μg/ml), or IL-2 (500 U/ml). Twenty four hrs before harvest, 0.2μCi ³H-TdR was added and uptake of ³H-TdR was measured, in a liquid scintillation counter.

^{a)} cpm±S.D.

Table 4. NK activity of splenocytes from CB-17 and SCID mice

mice	pretreatment ^{a)}	Target cells					
		YAC-1			P815		
		100:1 ^{b)}	50:1	25:1	100:1	50:1	25:1
CB-17	(-)	2.6 ^{c)}	2.0	0.3	1.7	<0.1	<0.1
	poly I:C i.p.	32.9	25.0	16.2	4.9	1.9	0.7
SCID	(-)	18.5	12.4	9.1	2.0	0.8	0.8
	poly I:C i.p.	78.2	63.6	50.3	12.6	9.0	5.7

^{a)} Mice received an i.p. administration of poly I:C 24-hr before sacrifice

^{b)} Effector: target ratio

^{c)} % cytotoxicity

に対しては poly I:C 投与によっても、有意な細胞傷害活性の増強は示さなかった。

NK 細胞の性状を検討するために抗体-補体処理を行うと CB-17, SCID マウス脾細胞ともに抗 aGM₁ 血清で活性は失活した。一方、抗 Thy-1 抗体では CB-17 マウスで一部失活するが、SCID マウスでは不変だった (図 2)。即ち、CB-17 マウスの NK 細胞は Thy-1⁺ aGM₁⁺ であり、SCID マウスの NK 細胞は Thy-1⁻ aGM₁⁺ であった。

IV. LAK 細胞の誘導条件

LAK の誘導条件を決定するため CB-17 マウス脾細胞を用いて検討した (図 3)。P815 に対する障害活性は 3 日目までピークとなり、IL-2 濃度は 250U/ml ではほぼプラトーとなった。よって以後の実験では IL-2 500U/ml 添加、3 日間培養後の LAK 活性を測定した。

V. LAK 活性

CB-17, SCID および Nude マウス脾細胞の LAK 活性を比較した (図 4)。三者とも、ほぼ同程度

の LAK 活性が誘導できた。同様に NK 感受性細胞株である YAC-1 に対しても障害活性がみられた。

VI. LAK エフェクター細胞の性状

LAK エフェクター細胞の性状を検討するため培養後の脾細胞に抗体-補体処理を行った (図 5)。三者とも抗 Thy-1 抗体で LAK 活性は低下したが、抗 aGM₁ 血清、抗 Lyt-2 抗体ではほとんど低下しなかった。

しかし、最近の研究で aGM₁ 血清による補体処理では培養細胞が補体抵抗性になることが知られている¹⁰⁾。このため、Panning 法を用いて LAK エフェクター細胞をさらに検討した (図 6)。LAK 活性は抗体-補体処理の場合とは異なり CB-17, SCID マウスとも aGM₁⁺ 細胞群で非分画細胞 (UF) よりも高い LAK 活性が誘導できた。一方、aGM₁⁻ 細胞群はむしろ UF よりも低かった。なお、Panning 法による LAK エフェクター細胞中の aGM₁⁺ 細胞の比率は UF において CB-17 は 30%、SCID は 45% であり、aGM₁⁺ 群ではともに 80%、aGM₁⁻ 群では CB-17 で

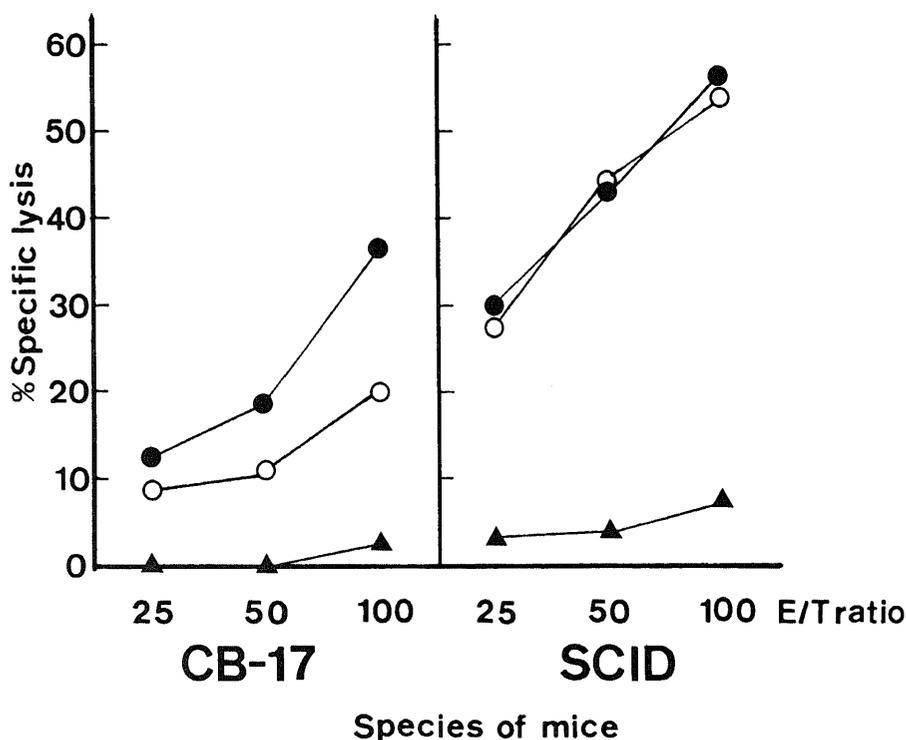
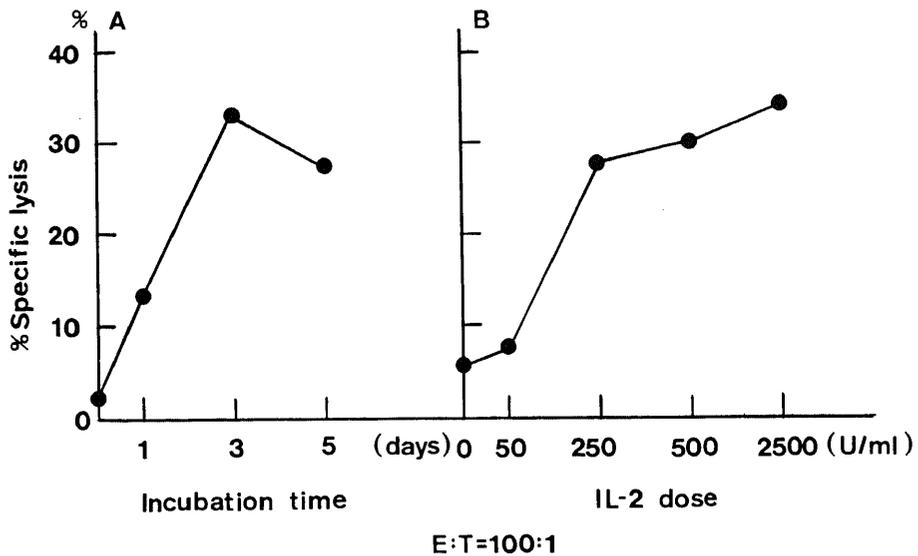


Fig. 2. Phenotypic characterization of poly I:C boosted NK activity. Splenocytes were treated with C' only (○-○), C'+anti-Thy-1 (●-●), or C'+anti-aGM₁ (▲-▲). This figure shows the typical result of one of two experiments.



E:T=100:1

Fig. 3. (A), Kinetics of IL-2-induced cytotoxicity of CB-17 splenocytes against P815. Splenocytes were cultured with IL-2 (500 U/ml) for various time periods. E/T ratio was 100. (B), Dose response curve of IL-2-induced cytotoxicity of CB-17 splenocytes against P815. Splenocytes were cultured for 3 days with various concentrations of IL-2. E/T ratio was 100. Similar results were obtained in another experiments.

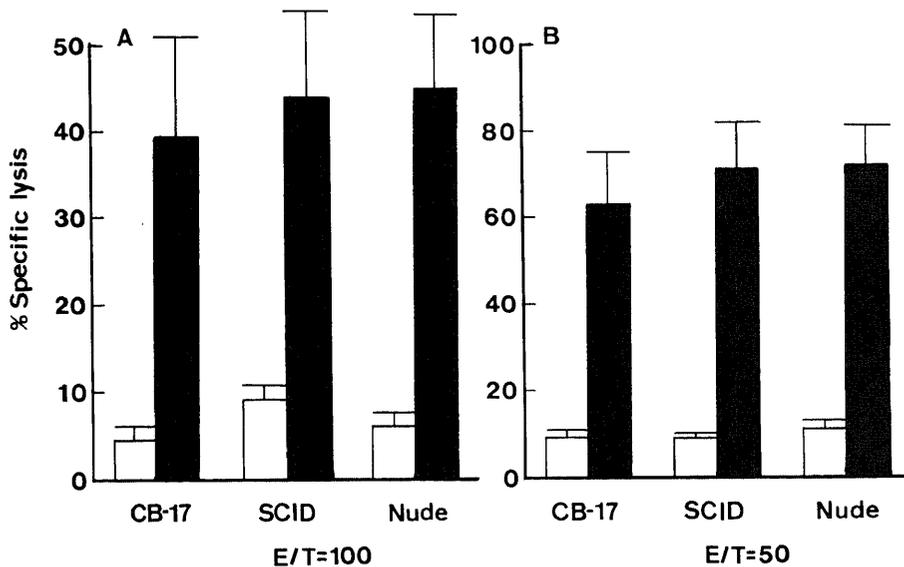


Fig. 4. IL-2-induced cytotoxicity of splenocytes against P815 (A) and YAC-1 (B). Splenocytes were cultured for 3 days with medium alone (□) or 500 U/ml of IL-2 (■). Data represent the mean percent \pm S. D. of five separate experiments.

5%, SCID で25%だった。また、培養後の脾細胞の表面マーカーを検索すると三者ともに Thy-1⁺ 細胞が60~80%みられたが、SCID および Nude マウスでは Lyt-1, Lyt-2 および L3T4 陽性細胞はみられなかった。さらに SCID マウスでは s-Ig 陽性細胞もみられなかった。

以上より LAK エフェクター細胞は三者とも Thy-1⁺, aGM₁⁺ 細胞が主体であると考えられた。

VII. 抗 aGM₁ 血清 in vivo 投与

LAK 前駆細胞をみるために抗 aGM₁ 血清を in vivo 投与し、マウス脾細胞の LAK 活性を検討した。in vivo 投与群の培養前脾細胞の表面マーカーに

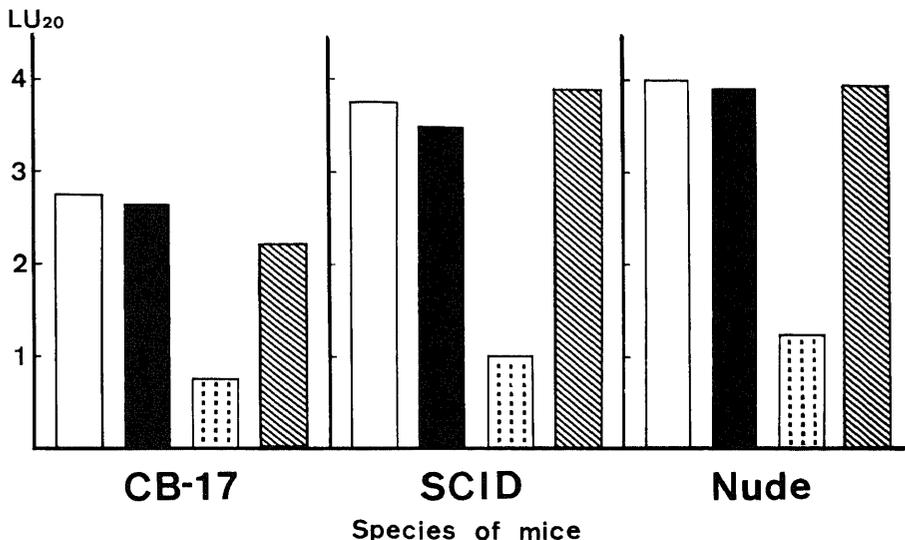


Fig. 5. Phenotypic characterization of LAK effector cells by treatment with antibody+C'.

Splenocytes cultured with IL-2 (500 U/ml) for 3 day, were treated with C' only (□), C'+anti-aGM₁ (■), C'+anti-Thy-1 (▨), or C'+anti-Lyt-2 (▩). Similar results were obtained in two other experiments.

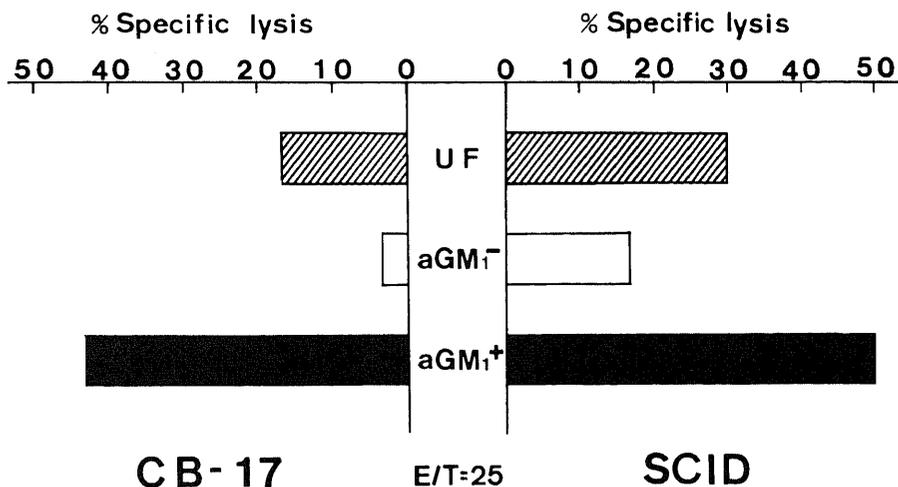


Fig. 6. Phenotypic characterization of IL-2-induced LAK effector cells by panning method.

This figure shows the typical result of one of two experiments.

UF, unfraction

において aGM_1^+ 細胞は 1% 以下であり, SCID および Nude マウス脾細胞では Thy-1⁺ 細胞も 2% 以下であった (表 5). この事より SCID および Nude マウス脾細胞において Thy-1 抗原のほとんどが aGM_1^+ 細胞上に発現していると考えられた. また *in vivo* 投与群の P815 および YAC-1 に対する細胞障害活性はなく, 形態的に LGL もみとめられなかった.

VIII. LAK 前駆細胞の性状

抗 aGM_1 血清 *in vivo* 投与群から誘導される LAK 活性は CB-17 マウスではほとんどみられな

かったのに対し SCID および Nude マウスでは無処理対照群と同程度まで誘導できた (図 7). 培養後の表面マーカーにおいて CB-17 マウスは aGM_1^+ 細胞が 10% 以下であり, 形態的に LGL もほとんどみられなかった. 一方, SCID および Nude マウスでは Thy-1⁺, aGM_1^+ 細胞ともに 30~40% あり, LGL もみられた.

以上より CB-17 マウスの LAK 前駆細胞は aGM_1^+ 細胞であったのに対し, SCID および Nude マウスでは Thy-1⁻, aGM_1^- 細胞群から LAK が誘導

Table 5. Phenotypical change of splenocytes after *in vivo* administration of anti- aGM_1 serum

mice	pretreatment	% positive cells ^{a)}				
		Thy-1	Lyt-1	Lyt-2	s-Ig	aGM_1
CB-17	(-)	32.1±3.6 ^{b)}	28.8±5.1	9.8±1.8	57.0±4.2	7.2±2.7
	anti- aGM_1 i.v.	25.6±6.0	23.7±4.9	6.7±2.3	62.0±6.7	0.5±0.2
SCID	(-)	13.7±4.0	0.3±0.1	0.8±0.3	0.9±0.6	26.3±9.9
	anti- aGM_1 i.v.	1.3±0.7	0.5±0.3	1.3±0.8	0.8±0.9	0.8±0.2
Nude	(-)	5.5±1.9	0.9±0.1	0.8±0.3	75.3±5.6	21.9±5.2
	anti- aGM_1 i.v.	1.2±0.5	1.0±0.2	0.5±0.1	79.1±7.2	0.5±0.3

^{a)} Evaluated by immunofluorescence using flow cytometry.

^{b)} mean±S.D. (n=4)

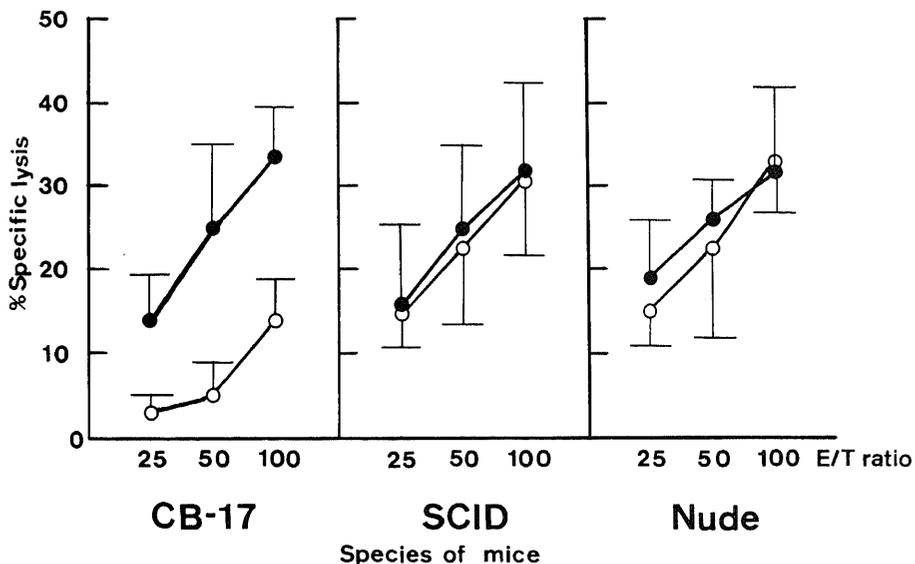


Fig. 7. Effect of injection of anti- aGM_1 on IL-2 induction of LAK activity. Splenocytes from mice pretreated by anti- aGM_1 i. v. (○-○) or not (●-●), were cultured with IL-2 (500 U/ml) for 3 days. Data represent the mean percent± S. D. of four separate experiments.

された。

考 察

本研究で、SCID マウス脾細胞は T, B 細胞を欠如し、PHA, Con-A, PWM に対して反応しないが、免疫学的に正常であり対照として使用した CB-17 脾細胞と比べて、LGL および aGM_1^+ 細胞が高率に存在していることを示した。さらに SCID マウス脾細胞は IL-2 により反応して増殖し、NK 活性も充分みられた。通常、NK 細胞は IL-2 に反応して分裂増殖することが知られており、SCID 脾細胞において NK 活性をもつ細胞の表面マーカーが $Thy-1^-$, aGM_1^+ であった点を考えあわせると、SCID マウス脾細胞には NK 細胞が豊富に存在していると考えられた。

LAK 細胞は腫瘍免疫およびその臨床応用³⁰⁾の面より着目され、多くの研究がなされているが、その細胞由来については不明な点が多く、ことに NK 細胞と LAK 細胞との関係については明らかでない⁷⁻¹⁰⁾。よって SCID マウス脾細胞を用いて両細胞間の関係を検討することは NK 細胞が豊富に存在し、かつ T, B 両細胞の関与も除外できるという点で NK 細胞と LAK 細胞との関係について、より明確な解析ができると思われる。今回、この SCID マウス脾細胞において IL-2 を用いて LAK 細胞の誘導を試み、NK 細胞との相互関係について検討した。

著者は本研究で SCID マウスにおいて NK 細胞が正常に存在すると同時に IL-2 とともに培養することにより、SCID マウス脾細胞からは CB-17 マウス脾細胞と同程度の LAK 活性が誘導できることを明らかにした。IL-2 とともに培養した SCID および CB-17 マウス脾細胞の表面マーカーの解析で LAK エフェクター細胞は $Thy-1^+$, aGM_1^+ であることが示された。一般に NK 細胞は $Thy-1^{+/-}$, aGM_1^+ であるが³⁰⁾, $Thy-1^-$ NK 細胞と $Thy-1^+$ NK 細胞とは同じ細胞であるとされている³²⁾。即ち $Thy-1^-$ NK 細胞は IL-2 存在下で容易に $Thy-1$ 抗原を強く発現することが知られており³³⁾, $Thy-1^+$ NK 細胞は $Thy-1^-$ NK 細胞が活性化した状態にすぎないとされている³²⁾。よって、 $Thy-1^-$, aGM_1^+ の表面マーカーをもつ SCID マウス NK 細胞は CB-17 マウスの NK 細胞と本質的に違いはないと考えられた。また、T 細胞を欠如する Nude, SCID 脾細胞ともにフローサイトメーター上、蛍光強度の弱い $Thy-1^+$ 細胞がみられたが抗 aGM_1 血清 in vivo 投与により $Thy-1^+$ 細胞が 2% 以下になったことは Nude および SCID とも $Thy-1$ 抗原のほとんどが aGM_1^+ 細胞上、即ち NK

細胞上に表現されているものと考えられた。以上より LAK エフェクター細胞の表面マーカーは CB-17, SCID マウスともに $Thy-1^+$, aGM_1^+ であることから IL-2 により主として NK 細胞から LAK エフェクター細胞が誘導されるものと推察された。NK 細胞と LAK 細胞の関係については以前より様々な報告がなされている⁷⁻¹⁰⁾。Merluzzi ら⁷⁾は抗体-補体処理により、マウス脾細胞の LAK 前駆細胞、エフェクター細胞とともに aGM_1^- であるため NK 細胞と LAK 細胞は異なる細胞であると報告した。しかしその後、Kalland ら¹⁰⁾は抗体-補体処理とソーティングを比較して aGM_1 に関しては LAK エフェクター細胞が補体抵抗性になることを示し、Ballas ら¹³⁾は LAK 前駆細胞の検討においても Merluzzi らの用いた抗 aGM_1 血清は量的に不充分であったと指摘した。よって、最近では LAK 細胞は IL-2 により活性化された NK 細胞が主体をなし、 $Thy-1^+$, $Lyt-2^+$ の T 細胞も一部関与しているという考え方になりつつある³⁴⁾。またこの $Thy-1^+$, $Lyt-2^+$ T 細胞は細胞障害活性をもつまでに 5~7 日間以上の培養が必要であるとされている^{13,35)}。このため CB-17 マウスにおいて抗 $Lyt-2$ 抗体での補体処理で LAK 活性がさほど低下しなかったのは 3 日間培養のため $Thy-1^+$, $Lyt-2^+$ T 細胞からの LAK 活性が充分誘導されなかったためと考えられた。SCID マウスにおいては培養後も T, B 細胞マーカーの発現はなく、LAK 細胞の誘導に T, B 両細胞は必要ないと思われた。

さらに抗 aGM_1 血清 in vivo 投与による LAK 前駆細胞の検討では CB-17 マウスの LAK 前駆細胞は aGM_1^+ 細胞群に含まれ、LAK エフェクター細胞が $Thy-1^+$, aGM_1^+ であることを考えあわせると免疫学的に正常な CB-17 マウスにあっても LAK 細胞は NK 細胞が主体であると思われた。一方、SCID および Nude マウスともに LAK 前駆細胞は $Thy-1^-$, aGM_1^- であり CB-17 マウスの場合と著しく異なった。しかし、SCID および Nude マウスの抗 aGM_1 血清 in vivo 投与群では培養前にはなかった LGL および $Thy-1^+$, aGM_1^+ 細胞が培養後に出現することから $Thy-1^-$, aGM_1^- 細胞は NK 細胞とは全く別の細胞とは考えにくく NK 前駆様細胞に属する細胞群であると考えられた。Hackett ら^{36,37)}や Kalland³⁸⁾は骨髄中の NK 前駆細胞は $Thy-1^-$, aGM_1^- であり、その分化成熟に IL-2 の必要性を報告している。よって SCID および Nude マウス脾臓中には本来なら骨髄中に存在する NK 前駆様細胞がかなり存在し、この細胞から IL-2 により LAK 細胞が誘導されたと考え

られた。この NK 前駆様細胞が SCID および Nude マウス脾臓中に存在している理由は IL-2 を含めて何らかの因子の不足が原因で十分に NK 細胞へ分化成熟できなかったためと考えられた。本研究では CB-17, SCID および Nude マウス脾細胞を用いた検討より, LAK 細胞は主として NK 細胞およびその前駆細胞により誘導されることを明らかにしたが, ヒトならびに実験動物を用いた種々の研究では LAK 前駆細胞として NK 細胞, T 細胞, non-T 細胞など heterogeneity が指摘されている⁷⁻¹⁰。SCID マウスにあっては表面マーカーならびに機能検査の上でも T 細胞の完全欠損がみられるが, T 細胞腫の自然発症が報告されている²¹。このことは SCID マウスにおいて成熟 T 細胞のマーカーを有さない未熟 T 細胞の存在が暗示される。aGM₁ の表面形質は NK 細胞の指標として広く使用されているが最近の Suttles²² や Stout²³ の報告によれば NK 細胞を含め種々の細胞に分布し, ことに活性化 T 細胞において強く発現されることが示された。以上のことより SCID マウス脾細胞でみられる LAK 細胞は NK 細胞のみならず, 未熟 T 細胞から誘導される可能性もある。この点については SCID マウス脾細胞より LAK 細胞株の樹立, さらにはこれらの T 細胞抗原レセプターの遺伝解析など今後の検討が必要である

結 論

本研究では CB-17, SCID および Nude マウス脾細胞において IL-2 を用いて LAK 細胞の誘導を試み, 加えて NK 細胞と LAK 細胞との相互関係を検討し, 以下の結果を得た。

1. SCID 脾細胞は T, B 両細胞とも欠くが, NK 細胞は十分に存在していた。
2. SCID 脾細胞より CB-17 および Nude マウスと同程度の LAK 活性が誘導できた。
3. LAK エフェクター細胞は CB-17, SCID マウスともに Thy-1⁺ aGM₁⁺ であった。
4. LAK 前駆細胞は CB-17 マウスでは aGM₁⁺ であったが, SCID および Nude マウスでは Thy-1⁻ aGM₁⁻ であった。

以上から CB-17, SCID マウスとも NK 細胞が LAK 細胞の主体をなすと考えられたが, SCID および Nude マウスでは脾臓中に CB-17 マウスと異なり, Thy-1⁻ aGM₁⁻ の NK 前駆様細胞群が存在し, この細胞群から LAK 細胞が誘導されるものと考えられた。SCID および Nude マウス脾細胞でこのような NK 前駆様細胞群が比較的好くみられるという事実

は SCID および Nude マウスにおいては IL-2 を含めて何らかの因子の不足を機序とする NK 細胞の分化成熟障害が示唆された。

謝 辞

稿を終るに臨み, 研究の御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部小児科谷口昂教授に深甚な感謝の意を表します。また, 直接御指導, 御校閲頂きました宮脇利男講師, 三浦正義助手はじめ, 終始研究に御協力頂きました犀川太先生, 小児科免疫グループの諸兄, ならびに教室員の皆様に深謝致します。

なお, 本論文の要旨は第17回日本免疫学会総会(金沢, 1987)において発表した。

文 献

- 1) 湊 長博: IV. ナチュラル・キラー細胞(1) - その機能的特性 - . Medical Immunology, 9, 557-564 (1985).
- 2) 湊 長博: V. ナチュラル・キラー細胞(2) - 自然抵抗性における役割 - . Medical Immunology, 9, 705-711 (1985).
- 3) Timonen, T. & Saksera, E.: Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation. J. Immunol. Methods, 36, 285-291 (1980).
- 4) Lanier, L. L., Phillips, J. H., Hackett, J. Jr., Iutt, M. & Kumar, V.: Opinion, natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. J. Immunol., 137, 2735-2739 (1986).
- 5) 安保 徹, 伊藤公志, 熊谷勝男: NK および K 細胞のトピックス. 臨床免疫, 19, 157-162 (1987).
- 6) Grimm, E. A., Ramsey, K. M., Mazumder, A., Wilson, D. J., Djeu, J. Y. & Rosenberg, S. A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. J. Exp. Med., 155, 1823-1841 (1982).
- 7) Merluzzi, V. J.: Comparison of murine Lymphokine-activated killer cells and cytotoxic T lymphocytes. Cell. Immunol., 95, 95-104 (1985).
- 8) Andriole, G. L., Mule, J. J., Hansen, C. T., Linehan, W. M. & Rosenberg, S. A.: Evidence that Lymphokine-activated killer cells and natural killer cells are distinct based on an analysis of congenitally immunodeficient mice. J. Immunol., 135, 2911-2913 (1985).
- 9) Merluzzi, V. J., Smith, M. D. & Last-

- Barney, K.:** Similarities and distinctions between murine natural killer cells and Lymphokine-activated killer cells. *Cell. Immunol.*, **100**, 563-569 (1986).
- 10) **Yang, J. C., Mule, J. J. & Rosenberg, S. A.:** Murine Lymphokine-activated killer (LAK) cells: Phenotypic characterization of the precursor and effector cells. *J. Immunol.*, **137**, 715-722 (1986).
- 11) **Ballas, Z. K.:** Lymphokine-activated killer (LAK) cells I. Differential recovery of LAK, natural killer cells, and cytotoxic T lymphocytes after a sublethal dose of cyclophosphamide. *J. Immunol.*, **137**, 2380-2384 (1986).
- 12) **Merluzzi, V. J., Trail, P. A. & Last-Barney, K.:** Differential expression of Lymphokine-activated killer cells and natural killer cells in adoptive transfer experiments utilizing fractionated bone marrow. *J. Immunol.*, **137**, 2425-2427 (1986).
- 13) **Ballas, Z. K., Rasmussen, W. & Oteghan, J. K.:** Lymphokine-activated killer (LAK) cells II. Delineation of distinct murine LAK-precursor subpopulations. *J. Immunol.*, **138**, 1647-1652 (1987).
- 14) **Salup, R. R., Mathieson, B. J. & Wiltrout, R. H.:** Precursor phenotype of Lymphokine-activated killer cells in the mouse. *J. Immunol.*, **138**, 3635-3639 (1987).
- 15) **Kalland, T., Belfrage, H., Bhiladvala, P. & Hedlund, G.:** Analysis of the murine Lymphokine-activated killer (LAK) cell phenomenon: dissection of effectors and progenitors into NK and T-like cells. *J. Immunol.*, **138**, 3640-3646 (1987).
- 16) **Itoh, K., Tilden, A. B., Kumagai, K. & Balch, C. M.:** Leu-11⁺ lymphocytes with natural killer (NK) activity are precursors of recombinant interleukin 2 (rIL-2)-induced activated killer (AK) cells. *J. Immunol.*, **134**, 802-807 (1985).
- 17) **Phillips, J. H. & Lanier, L. L.:** Dissection of Lymphokine-activated killer phenomenon: relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytotoxicity. *J. Exp. Med.*, **164**, 814-825 (1986).
- 18) **Damle, N. K., Doyle, L. V. & Bradley, E. C.:** Interleukin 2-activated human killer cells are derived from phenotypically heterogeneous precursors. *J. Immunol.*, **137**, 2814-2822 (1986).
- 19) **Bosma, G. C., Custer, R. P. & Bosma, M. J.:** A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, **301**, 527-530 (1983).
- 20) **Schultz, L. D. & Sidman, C. L.:** Genetically determined murine models of immunodeficiency. *Ann. Rev. Immunol.*, **5**, 367-403 (1987).
- 21) **Custer, R. P., Bosma, G. C. & Bosma, M. J.:** Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse: Pathology, reconstitution, neoplasms. *Am. J. Pathol.*, **120**, 464-477 (1985).
- 22) **Dorshkind, K., Keller, G. M., Phillips, R. A., Miller, R. G., Bosma, G. C., O'Toole, M. & Bosma, M. J.:** Functional status of cells from lymphoid and myeloid tissues in mice with severe combined immunodeficiency disease. *J. Immunol.*, **132**, 1804-1808 (1984).
- 23) **Dorshkind, K., Pollack, S. B., Bosma, M. J. & Phillips, R. A.:** Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (SCID). *J. Immunol.*, **134**, 3798-3601 (1985).
- 24) **Djeu, J. J., Heinbaugh, J. A., Holden, H. T. & Herberman, R. B.:** Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers. *J. Immunol.*, **122**, 175-181 (1979).
- 25) **Wysocki, L. J. & Sato, V. L.:** "Panning" for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2844-2848 (1978).
- 26) **Ledbetter, J. A., Evans, R. L., Lipinski, M., Cunningham-Rundles, C., Good, R. A. & Herzenberg, L. A.:** Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor populations in mouse and man. *J. Exp. Med.*, **153**, 310-323 (1981).
- 27) **Dialynas, D. P., Quan, Z. S., Wall, K. A., Pierres, A., Quintans, J., Loken, M. R., Pierres, M. & Fitch, F. W.:** Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK 1.5: similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule. *J. Immunol.*, **131**, 2445-2451 (1983).
- 28) **Kasai, M., Iwamori, M., Nagai, Y., Oku-**

- mura, K. & Tada, T.:** A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur. J. Immunol.*, **10**, 175-180 (1980).
- 29) Ledbetter, J. A., Rouse, R. V., Micklem, H. S. & Herzenberg, L. A.:** T cell subsets defined by expression of Lyt-1, 2, 3, and Thy-1 antigens. *J. Exp. Med.*, **152**, 280-295 (1980).
- 30) Herberman, R. B., Nunn, M. E. & Holden, H. T.:** Low density of Thy-1 antigen on mouse effector cells mediating natural cytotoxicity against tumor cells. *J. Immunol.*, **121**, 304-309 (1978).
- 31) Rosenberg, S. A. & Lotze, M. T.:** Cancer immunotherapy using interleukin-2 and interleukin-2-activated lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.*, **4**, 681-709 (1986).
- 32) Hackett, J. Jr., Bosma, G. C., Bosma, M. J., Bennett, M. & Kumar, V.:** Transplantable progenitors of natural killer cells are distinct from those of T and B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3427-3431 (1986).
- 33) Brooks, C. G., Urdal, V. L. & Henney, C. S.:** Lymphokine-driven "differentiation" of cytotoxic T-cell clones into cells with NK-like specificity. : correlation with display of membrane macromolecules. *Immunol. Rev.*, **72**, 43-72 (1983).
- 34) Herberman, R. B., Hiserodt, J., Vujanovic, N., Balch, C., Lotovosa, E., Bolhuis, R., Golb, S., Lanier, L. L., Phillips, J. H., Riccardi, C., Ritz, J., Santoni, A., Schmidt, R. E. & Uchida, A.:** Lymphokine-activated killer (LAK) cell activity: Characteristics of effector cells and their progenitors in blood and spleen. *Immunol. Today*, **8**, 178-181 (1987).
- 35) 安保 徹, 伊藤公志, 沢田秀明:** NK 細胞をめぐって—最近の知見から. *臨床免疫*, **19**, 361-376 (1987).
- 36) Hackett, J. Jr., Bennett, M. & Kumar V.:** Origin and differentiation of natural killer cells I. Characteristics of a transplantable NK cell precursor. *J. Immunol.*, **134**, 3731-3738 (1985).
- 37) Hackett, J. Jr., Tutt, M., Lipscomb, M., Bennett, M., Koo, G. & Kumar, V.:** Origin and differentiation of natural killer cells II. Functional and morphologic studies of purified NK-1.1⁺ cells. *J. Immunol.*, **136**, 3124-3131 (1986).
- 38) Kalland, T.:** Generation of natural killer cells from bone marrow precursors in vitro. *Immunology*, **57**, 493-498 (1986).
- 39) Suttles, J., Schwarting, G. A. & Stout, R. D.:** Flow cytometric analysis reveals the presence of asialo G_{M1} on the surface membrane of alloimmune cytotoxic T cells. *J. Immunol.*, **136**, 1586-1591 (1986).
- 40) Stout, R. D., Schwarting, G. A. & Suttles, J.:** Evidence that expression of asialo G_{M1} may be associated with cell activation: correlation of asialo G_{M1} expression with increased total cellular RNA and protein content in normal thymocyte and spleen cell populations. *J. Immunol.*, **139**, 2123-2129 (1987).

Phenotypic Characterization of LAK (Lymphokine-Activated Killer) Cells Inducible in Severe Combined Immunodeficiency and Nude Mice Masaki Hasui, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **97**, 362—375 (1988)

Key words: lymphokine-activated killer, natural killer, nude mice, mice with severe combined immunodeficiency

Abstract

Although most lymphokine-activated killer (LAK) activity generated from blood or spleen lymphocytes appears to be derived from cells characteristic of natural killer (NK) cells, some investigators have postulated that LAK activity can also be induced from some T-lineage cells. In the present work, phenotypic characteristics of precursor and effector cells for LAK activity were evaluated by using splenocytes from CB-17 control mice, SCID (severe combined immunodeficiency) mice lacking T and B cells, and athymic nude mice. The relative frequencies of aGM_1^+ cells, which denote mouse NK cells, were much higher in splenocytes from SCID mice ($28.3\% \pm 5.7\%$) and nude mice ($20.3\% \pm 6.1\%$) than in CB-17 mice ($9.6\% \pm 3.6\%$). NK cell activity against YAC-1 targets, seemingly in parallel with the relative frequency of aGM_1^+ cells, was higher in SCID mice compared to that in CB-17 mice either before or after the treatment of poly I : C. Cells with NK activity in CB-17 mice largely expressed Thy-1⁺, aGM_1^+ phenotype, while NK cells in SCID mice appeared to be Thy-1⁻, aGM_1^+ cells, suggesting the existence of a fundamental phenotypic similarity among these NK cells. An efficient and comparable cytotoxicity against NK-resistant P815 cells (LAK activity) was inducible by a 3-day culture of splenocytes with interleukin 2 (IL-2) in each group of mice, and the majority of these LAK effector cells expressed Thy-1⁺, aGM_1^+ phenotype. The in vivo administration of anti- aGM_1 sera eliminated efficiently splenic resident aGM_1^+ cell. Subsequently, LAK induction assay with IL-2 was carried out with splenocytes in vitro. Only a negligible induction of LAK activity was observed in anti- aGM_1 -treated CB-17 mice, whereas in SCID and nude mice, the grade of induced LAK activity was comparable with that of splenocytes from untreated controls. From these results, it was speculated that LAK precursor cells in SCID and nude mice are mostly aGM_1^- cells which respond to IL-2 to express Thy-1⁺, aGM_1^+ phenotype, while LAK precursors in CB-17 mice express aGM_1^+ phenotype. Thus, aGM_1^- progenitors for LAK activity appear to be at much earlier stage of maturation than aGM_1^+ LAK precursors. The pool size of such aGM_1^- LAK progenitors in spleen of SCID and nude mice might be extremely expanded, probably because of the intrinsic lack of some T cell-derived factors such as IL-2.