

## 長期リンパ球混合培養で誘導される 抑制性T細胞の免疫学的解析

岡山大学医学部第一外科学教室 (指導: 折田薫三教授)

壺 井 克 敏

(平成4年5月15日受稿)

**Key words:** 抑制性T細胞, リンパ球混合培養,  
mixed lymphocyte reaction, cell-mediated lympholysis

### 緒 言

免疫反応の調節, 平衡維持に免疫応答を負の方向に調節する抑制性T細胞 (suppressor T cells, Ts) が重要な働きをしている事は広く知られている。臓器移植においても, 移植片の長期生着や, 移植前ドナー特異的輸血 (donor-specific transfusions, DST) のメカニズムとして Ts の働きが重要視されている<sup>1)</sup>。従来より, 我々も DST により Ts が誘導され, その誘導が急性拒絶反応減少及び移植片生着延長に関与することを指摘してきた<sup>2)-5)</sup>。

Ts の同定, 作用機序及び Ts 由来の可溶性因子, さらに Ts の機能発現にいたるT細胞亜集団の相互作用等の解析は, 主としてマウスを用いた実験で行われている<sup>6)</sup>。今回, 我々は, ヒトの末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocytes, PBL) を用い, 長期リンパ球混合培養 (mixed lymphocyte culture, MLC) より Ts を誘導し, そのフェノタイプを解析すると同時に, その抑制機序について検討を行った。

### 対象と方法

#### 1. PBL 分離と培養液

健康成人から採血したヘパリン加血を Ficoll-Conray 比重遠沈法により単核細胞層を分離した。培養液は, RPMI 1640 medium (Gibco) に, streptomycin 100  $\mu$ g/ml, penicillin-G 100 units/ml, を混入し, さらに非働化ヒト AB 血清を20%加えたものを用いた。

#### 2. MLC よりの Ts の誘導

responder 細胞  $1 \times 10^7$ 個と, mitomycin C (MMC) 処理した stimulator 細胞  $1 \times 10^7$ 個を 20ml培養液にて, 25cm<sup>2</sup> culture flask (Costar 3050) に混入し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95%湿度下にそれぞれの期間培養した (bulk MLC)。この後, 細胞を採取, 洗浄し, さらに, MMC 処理後 regulator 細胞として, mixed lymphocyte reaction (MLR) 及び cell-mediated lympholysis assay (CML) に添加し, その抑制率を検討した (図1)。

#### 3. MLR suppressor cell assay (MLRsca)

$5 \times 10^4$ 個の responder 細胞と  $5 \times 10^4$ 個の MMC 処理した stimulator 細胞よりなる MLC に, MMC 処理した regulator 細胞  $5 \times 10^4$ 個を加え, 0.2mlの培養液中で, 96穴丸底マイクロプレート (Falcon 2077) にて, quadruplicate で培養を行った。kinetics study 以外6日間培養とし, ハーベストの18時間前に<sup>3</sup>Hチミジンをパルスし, 液体シンチレーションカウンターにて, <sup>3</sup>Hチミジン摂取を測定した。responder 細胞と同一の細胞 (autologous 細胞) を MMC 処理し, regulator 細胞と同数加えたものを, コントロール群とし, 次式により MLR 抑制率を算出した。MLR 抑制率 =  $(1 - \text{cpm with MMC 処理 regulator 細胞} / \text{cpm with MMC 処理 autologous 細胞}) \times 100$ 。

#### 4. CML suppressor cell assay (CMLsca)

$1 \times 10^6$  responder 細胞,  $1 \times 10^6$  stimulator 細胞,  $1 \times 10^6$  regulator 細胞を 2 ml培養液にて,

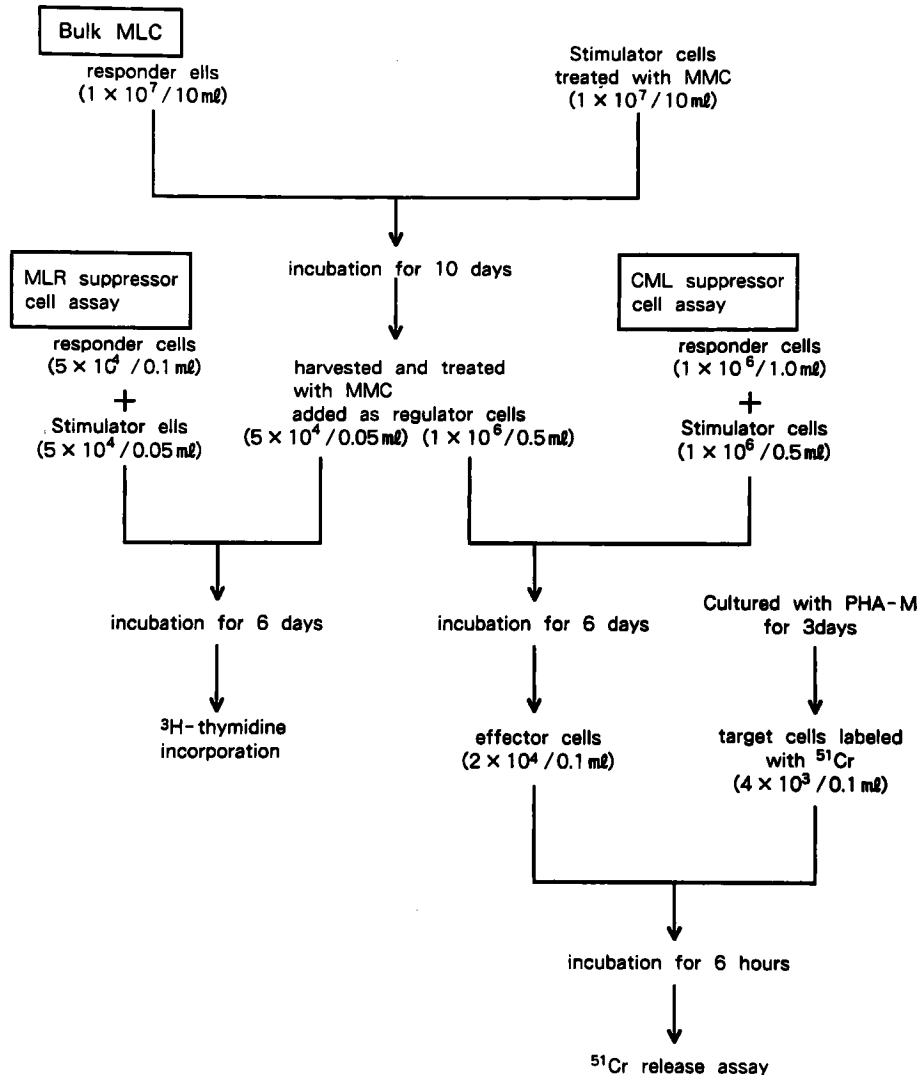


図1 Experimental scheme for analysis of the generation of Ts.

カルチャープレート (Faclon 3047) で6日間混合培養し、その後 effector 細胞として回収した。target 細胞は、PHA-M (Difco) にて芽球化した細胞を  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  で標識し、洗浄後  $4 \times 10^4$  個/mlに調整した。effector 細胞と target 細胞を50:1の比率で96穴丸底マイクロプレート内で総量0.2mlとし、triplicateで6時間培養した。培養後0.1mlの上清を摂取し、オートガンマカウンターにて $^{51}\text{Cr}$  releaseを測定した。spontaneous releaseは培養液のみ、maximum releaseは1N NaOHを加え、target細胞の $^{51}\text{Cr}$  releaseを測定した。 $\%^{51}\text{Cr}$  releaseは次式の如く算出

した。 $\%^{51}\text{Cr}$  release = (experimental release - spontaneous release / maximum release - spontaneous release)  $\times 100$ 。尚、コントロール群は、MLR scaと同様に、regulator細胞の代わりにMMC処理したautologous細胞を加え、CML抑制率は次式より求めた。CML抑制率 =  $(1 - ^{51}\text{Cr}$  release with MMC処理regulator細胞 /  $^{51}\text{Cr}$  release with autologous細胞)  $\times 100$ 。

#### 5. T細胞サブセットの分離

OKT 4及びOKT 8モノクローナル抗体 (MoAb, Ortho)を用い、Wyscokiらのパニン

グ法<sup>7)</sup>に準じ、OKT 4<sup>+</sup>enriched 細胞, OKT 8<sup>+</sup>enriched 細胞を得た。即ち、細胞を OKT 4 あるいは OKT 8 MoAb で反応させた後、ラビット抗マウス IgG 抗体 (Sigma) を含む溶液で coating したプラスチックデイッシュに加え、4 °C 2 時間反応させた。次に、negative selection として、上清中に含まれる細胞を摂取し、OKT 8<sup>+</sup>enriched 細胞, OKT4<sup>+</sup>enriched 細胞とした。

6. MLRscs 培養上清中のインターロイキン 2 (interleukin-2, IL-2) 活性

前述した MLRscs 上清を経時的に採取し、IL-2 dependent cell line である CTLL-2 を用い Gillis らの方法<sup>8)</sup>に準じて IL-2 の力価を測定した。即ち、 $5 \times 10^4$ 個/ml の CTLL-2 0.1 ml を 96 穴平底マイクロプレート (Falcon 2072) に加え、さらに 0.1ml のサンプルを triplicate に添加し、24 時間培養の後、<sup>3</sup>Hチミジンをパルスした。さらに 4 時間培養しハーベスト、<sup>3</sup>Hチミジンの取り込みを測定した、recombinant IL-2

(シオノギ) より得られた標準曲線から、各培養上清中に含まれる IL-2 の力価を算出した。

結 果

1. MLC による Ts の誘導

MLC により誘導される Ts 活性を、特異的 MLR、即ち、responder, stimulator 細胞とも

表 1 Cytotoxicity and suppressor activity of the cells harvested from 10-day MLC

A. MLR suppressor cell assay <sup>a</sup>		cpm
R+Cm+Rm		46121±2218
R+Cm+R'Cm		28720±805
B. CML <sup>b</sup>		Target <sup>c</sup> % <sup>51</sup> Cr release <sup>d</sup>
RCm	C	3.8±3.0

a. R, responder cells; Cm, stimulator cells treated with MMC; R'Cm, MMC-treated regulator cells harvested from 10-day MLC

b. RCm, effector cells

c. Target cells (C) were incubated in PHA-M for 3 days.

d. CML assay was performed with E/T ratio of 50 : 1.

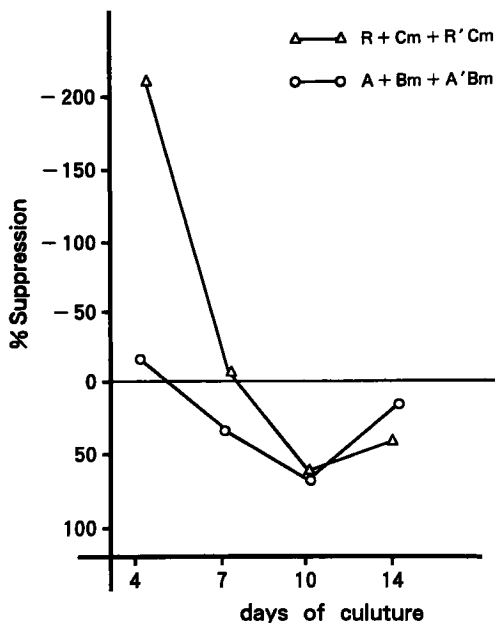


図 2 The generation of Ts in MLC. R, A, responder cells; Cm, Bm, stimulator cells treated with MMC; R'Cm, A'Bm, regulator cells treated with MMC. Regulator cells were harvested from bulk MLC at the indicated day.

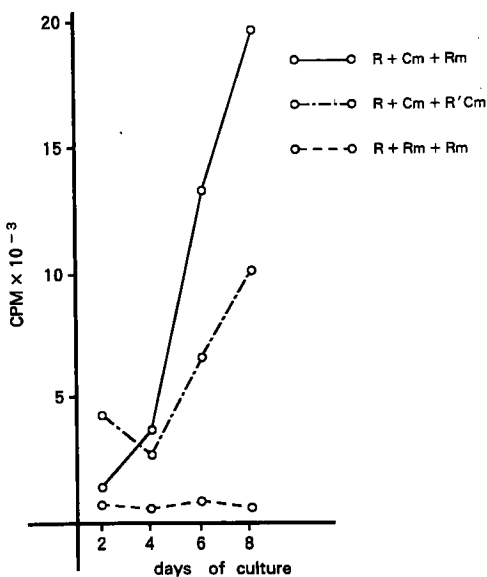


図 3 Kinetics study of MLR suppressor cell assay. R, responder cells; Cm, stimulator cells treated with MMC; Rm, autologous cells treated with MMC; R'Cm, MMC-treated regulator cells harvested from 10-day MLC.

表2 Antigen-specificity of Ts generated in 10-day MLC

MLR suppressor cell assay			<sup>3</sup> H-Thymidine Incorporation (cpm)	%Suppression
responder cells	stimulator cells	regulator <sup>a</sup> cells		
R	Cm	Rm	12369±1442	—
R	Cm	R'Cm	5284±851	58.0
C	Rm	Cm	11297±4688	—
C	Rm	R'Cm	15518±4155	-37.4
R	Xm	Rm	17072±1540	—
R	Xm	R'Cm	8042±2240	35.0
R	Ym	Rm	12369±2119	—
R	Ym	R'Cm	11084±1665	10.4
R	Zm	Rm	27873±2506	—
R	Zm	R'Cm	26254±318	5.8
A	Bm	Am	15424±2239	—
A	Bm	A'Bm	6099±1208	60.5
B	Am	Bm	34762±6853	—
B	Am	A'Bm	39460±4723	-13.5
A	Ym	Am	14783±2302	—
A	Ym	A'Bm	8849±2128	40.1
A	Zm	Am	15692±1954	—
A	Zm	A'Bm	12614±2309	19.6

a. Rm, Cm, Am, Bm, autologous cells treated with MMC; R'Cm, A'Bm, MMC-treated regulator cells harvested from 10-day MLC.

Bulk MLC と同一の MLR において、MLC より経時的に細胞を採取し、regulator 細胞として添加し、その抑制率を測定した。図2に示される様に Ts 活性は7日目以降に認められ、2例とも10日間 MLC より採取した細胞の Ts 活性が最も強く認められた(抑制率: 61%及び58%)。MLC よりの Ts 誘導には、10日間培養が最適と考えられ、以後の実験には、10日間 MLC より採取した細胞を regulator 細胞として用いた。

10日間 MLC より採取した細胞を effector 細胞とし、その細胞傷害作用を検討した。E/T比 50:1 で、<sup>51</sup>Cr release は3.8%と、細胞傷害活性は非常に低いものであった(表1)。

次に、MLRsc の kinetics study を行った(図3)。MLR 開始後6日目、8日目ともに、regulator 細胞の添加により、<sup>3</sup>Hチミジンの取り込みの抑制が観察された。Ts は、MLR を著明に抑制するものの、その kinetics には影響を与えなかった。

2. 10日間 MLC より誘導される Ts の特異性

表2に示す如く、10日間 MLC より誘導した Ts (R'Cm 及び A'Bm) と同一の responder 細胞 (R, A) 及び同じ stimulator 細胞 (Cm, Dm) よりなる特異的 MLRsc では、強い抑制(58.0%及び60.5%)が認められるのに対し、responder 細胞が異なる MLRsc の系 (C+Rm+R'Cm, B+Am+A'Bm) では、抑制は全く認められず、MLR はむしろ増強されていた。さらに、responder 細胞を bulk MLC と同一とし、third-party よりの stimulator 細胞 (Xm, Ym, Zm) を用いた MLRsc では、その抑制率は一定でなかった。30%以上の抑制を示すものが、5例中2例あったが、いずれも特異的 MLR での抑制に比較すると、弱いものであった。MLC で誘導される Ts は、HLA バリアーによる特異性を有していると思われる。

3. MLR を抑制する Ts のフェノタイプ

10日間 MLC より採取した細胞を、OKT4,

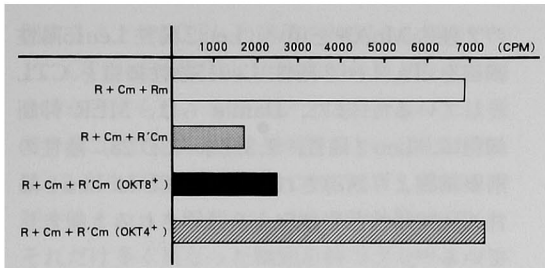


図4 T cell subsets of Ts generated in 10-day MLC by the panning method. R, responder cells; Cm stimulator cells treated with MMC; Rm, autologous cells treated with MMC; R'Cm, MMC-treated regulator cells harvested from 10-day MLC; R'Cm (OKT 8<sup>+</sup>), regulator cells treated with anti-OKT 4 MoAb; R'Cm (OKT 4<sup>+</sup>), regulator cells treated with anti-OKT 8 MoAb.

表3 CML suppressor cell assay

Exp.	CTL induction	Regulator <sup>a</sup> cells	% <sup>51</sup> Cr release <sup>b</sup>	%suppression
I	R+Cm	—	14.9	—
	R+Cm	R'Cm	8.7	41.6
	R+Xm	—	8.8	—
	R+Xm	R'Cm	14.8	-68.8
II	R+Cm	—	19.8	—
	R+Cm	R'Cm	12.2	38.4
	R+Cm	R'Cm (OKT8 <sup>+</sup> )	4.5	77.3
	R+Cm	R'Cm (OKT4 <sup>+</sup> )	19.1	3.5

a. R'Cm, 10-day MLC generated regulator cells, separated into R'Cm (OKT 8<sup>+</sup>) and R'Cm (OKT 4<sup>+</sup>) by the panning method.  
 b. CML assay was performed with E/T ratio of 50 : 1.

OKT 8 MoAb で処理し, OKT 8<sup>+</sup>enriched 分画と OKT 4<sup>+</sup>enriched 分画に分け, それぞれ MMC 処理し regulator 細胞として特異的 MLR に添加し, その抑制率をみた. 図4の如く, 未分画の regulator 細胞で, 74.6%の抑制率, OKT 8<sup>+</sup>enriched 分画では63.2%の抑制活性が認められるのに対し, OKT 4<sup>+</sup>enriched 分画では, MLR の抑制は認められなかった.

4. CML を抑制する Ts とそのフェノタイプ

10日間 MLC より誘導される Ts の細胞傷害性T細胞 (cytotoxic T cells, CTL) 誘導に対する阻害活性を検討した. 表3の実験Iに示される如く, 特異的 CML では, CTL の誘導を抑制するのに対し(抑制率: 41.1%), stimulator 細胞を third-party とした CML では, 抑制は

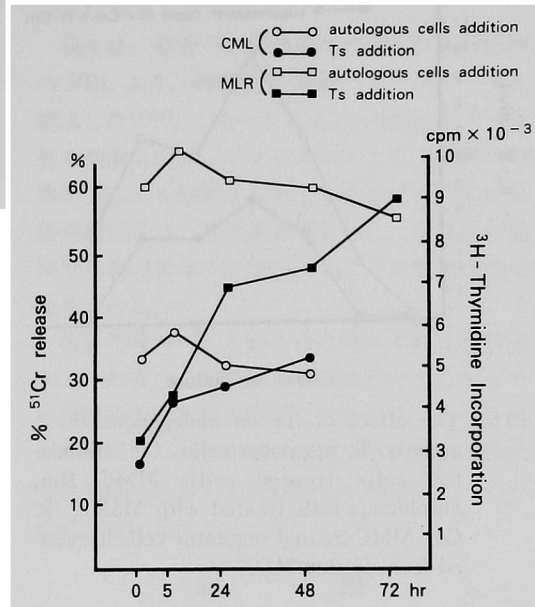


図5 Addition time of Ts. Regulator cells were added to the CML (●—●) and MLR (■—■) at the indicated time. In control groups, MMC-treated autologous cells were added to the CML (○—○) and MLR (□—□).

全く認められなかった. さらに, CML を抑制する Ts のフェノタイプの検討を行ったところ, 実験IIの如く, OKT 8<sup>+</sup>enriched 分画に抑制活性が示され(抑制率: 77.3%), OKT 4<sup>+</sup>enriched 分画には, 抑制活性は認められなかった.

5. Ts の添加時期の検討

MLR 及び CML に Ts を添加する時期を変化させる事の影響を検討した(図5). MLR 抑制効果は, Ts を培養開始と同時に添加する場合が, 最も強く, 以後添加時期を遅らせるに従い, MLR 抑制は減弱し, 培養開始後72時間以降の添加では, 抑制効果は認められなかった. CML 抑制効果も同様の傾向を示し, 培養開始24時間後での Ts 添加では, 抑制効果は減弱し, 48時間以降の添加は, CML を抑制しなかった.

6. 内因性 IL-2 に対する Ts の影響

通常の MLR の培養上清中には, 図6の open circle (○) に示される如く, 培養開始後3日目をピークとする, IL-2 活性が認められる. しかし, 特異的 MLR に Ts を加えた系では, closed

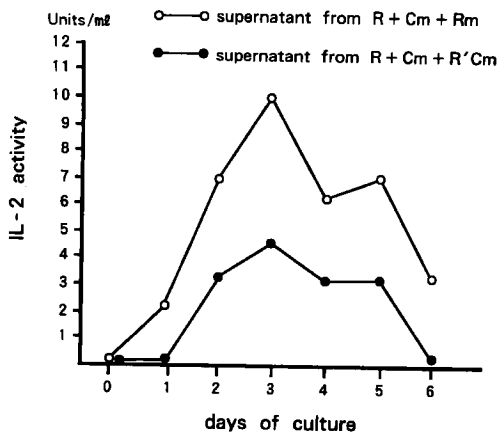


図6 The effect of Ts on endogenous IL-2 activity. R, responder cells; Cm, stimulator cells treated with MMC; Rm, autologous cells treated with MMC; R' Cm, MMC-treated regulator cells harvested from 10-day MLC.

circle (●) に示される様に、培養開始以降どの時期においても、培養上清中のIL-2活性は著明に低下していた。

### 考 察

今回の結果より、Ts誘導には10日間MLCが至適であり、誘導されるTsは、アロ抗原による増殖反応及びCTL誘導のいずれも阻害する事が示された。stimulator細胞に対する細胞傷害活性は非常に低く、MLR及びCML抑制は、細胞傷害作用によるものではないと考えられる。このTsは、responder細胞のHLA拘束性に、また抗原特異的に作用しているものと思われ、フェノタイプとしてOKT8 (CD8) 抗原を有している。抑制活性は、培養開始より早期に添加する場合にのみ認められ、培養開始と同時にTsを添加することにより、MLC上清中のIL-2活性は著明に抑制されていた。以上より、10日間MLCにより誘導されるTsの標的細胞は、おそらくMLC早期に反応するヘルパーT細胞(helper T cells, Th)と考えられる。

CD8陽性細胞中には、TsとCTLが含まれており、その機能とフェノタイプの関連について、多く研究されている。Landayらは、2D2 (Leu 2, CD 8) とD 12 (Leu 15, CD 11 b)

の2種のMoAbを用い、Leu 2陽性Leu15陽性細胞をTs、Leu 2陽性Leu15陰性細胞をCTLとしている<sup>9)</sup>。また、Darnellらは、MLR抑制細胞は、Leu 2陽性、9.3抗原(CD 28)陰性の前駆細胞より誘導され、一方CTLはLeu 2陽性CD 28陽性前駆細胞より誘導されると報告している<sup>10)</sup>。

10日間MLCより誘導されるTsはCD 8陽性で、MLRを抑制すると同時にCMLも抑制する。しかしながら、MLRを抑制するTsとCMLを抑制するTsが同一であるか否かは定かではない。Truittらは、マウスより誘導したTsより産出される2種類の抑制因子について報告し、1つはMLRのみを、もう一方はMLRとCMLのいずれも抑制するとしている<sup>11)</sup>。DorfとBenacerrafは、遅延型過敏症の抑制反応について、マウスでのモデルにて、Ts1, Ts2, Ts3という抑制性ネットワークを提唱している<sup>6)</sup>。Tsというサブセットの中には、種々のクローンが存在し、それぞれ異なった抑制機能を担っていると考えられる。ヒトのPBLを用いた実験系では、DarnellとEnglemanは以下のような抑制性ネットワークを提唱している<sup>10)12)</sup>。アロ抗原刺激されたLeu 3<sup>+</sup>, Leu 8<sup>+</sup>Tsインデューサー細胞が、Leu 2<sup>+</sup>CD 28<sup>-</sup>Ts前駆細胞に作用し、Leu 2<sup>+</sup>Tsエフェクター細胞に成熟・分化させる。このLeu 2<sup>+</sup>Tsエフェクター細胞が、種々の免疫反応を特異的に抑制するというネットワークである。最近、彼らは、ヒトのPBLより、アロ抗原刺激された自己のCD 4<sup>+</sup>細胞で自己のCD 8<sup>+</sup>細胞を繰り返し刺激することにより、CD 8<sup>+</sup>のTsクローンの樹立に成功し、そのフェノタイプは、 $\alpha \cdot \beta$  TCR<sup>+</sup>, CD 3<sup>+</sup>, CD 8<sup>+</sup>, CD 11 b<sup>+</sup>, CD 28<sup>-</sup>であったと述べている<sup>13)</sup>。10日間MLCにより誘導されるTsも、おそらくTsエフェクター細胞に相当するものと思われる。MLCより特異的CTLを誘導するのに6~7日間の培養が必要であるが、特異的Tsエフェクター細胞を誘導するには、さらに長い10日間培養を要するという事実は、非常に興味深い知見と考えられる。

TsがCTLの誘導を阻害するメカニズムについては、一定の見解は得られていない。Thを抑

制することで、CTLの誘導を抑制する場合<sup>10)14)</sup>と、CTL前駆細胞に直接抑制作用を及ぼす場合<sup>15)</sup>が考えられ、またIL-2に競合ないしは吸着することで抑制活性を発現するという報告<sup>15)</sup>や、IL-2産生細胞を抑制することでCTL誘導を抑制するといった報告がみられる<sup>14)</sup>。Tsの中に、それだけ多く異なった機能を持つクローンが存在する証拠と言えるかもしれない。我々は、10日間MLCより誘導されるTsには、IL-2に対して競合作用や吸着能力がないことを既に報告している<sup>16)</sup>。前述した様に、その標的細胞は、Thと考えられ、TsがMLC早期に反応するThに直接的に作用するか、あるいは液性因子を介し、IL-2産生を抑制し、CTL誘導を阻害しているものと思われる。

DSTによりTsが誘導され、その誘導が生体移植腎生着延長効果に関連している事は、我々の報告<sup>2)-5)</sup>を含め、多数報告されている<sup>17)18)</sup>。長期移植腎生着のメカニズムとして、Tsが作用している事も我々は指摘してきた<sup>19)</sup>。Fujiwaraらは、C57BL/6(B6)マウスとB6-C-H-2<sup>bm1</sup>あるいはB6-C-H-2<sup>bm12</sup>のミュータントマウス間でのDSTの効果を検討し、Thの低反応と皮膚移植片生着延長の相関を述べている<sup>20)21)</sup>。即ち、これらのミュータントマウス間で、前感が寛容源となり得る場合、Thの反応性が抗原特異的に消失することを指摘し、特異的免疫寛容導入におけるTh制御の重要性を強調している。もし、DSTにより誘導されるTsが10日間MLCにより誘導されるTsと同じ性質を持つならば、その標的細胞は抗原特異的に活性化するThであり、このThを抑制することに

より特異的免疫不応答を導いている可能性が推定される。

我々は、最近Ts誘導陽性のDST施行症例のPBLより、抑制性T細胞ハイブリドーマを樹立した<sup>22)23)</sup>。このハイブリドーマは、ドナー抗原の刺激により、レシピエント・ドナー間の特異的MLRを抑制する因子を産出する。この免疫抑制因子は、濃度依存性を示し、やはり培養開始早期に添加する場合のみ、その抑制活性が発現される。

抗原特異的Ts及びそれに関する免疫抑制因子の研究は、臓器移植の最終目標であるドナー特異的免疫寛容の解明につながり、さらに、これらのクローンあるいは因子を、臓器移植の免疫操作に応用する可能性にもつながっていくものと考えている。

## 結 論

10日間MLCにより誘導されるTsは、抗原特異的に作用し、MLR、CMLいずれの反応も抑制する。このTsは、OKT8陽性で、OKT4陽性細胞には、抑制活性は認められなかった。培養開始より早期に添加することで、Ts活性が発現され、MLC開始と同時にTsを加えることで、培養上清中のIL-2活性は著明に抑制された。このTsの標的細胞は、MLC早期に抗原特異的に反応するThと考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました岡山大学医学部第1外科折田薫三教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、終始御指導、御教示頂きました阪上賢一先生に深謝致します。

## 文 献

- 1) Hutchinson IV: Suppressor T cells in allogeneic models. *Transplantation* (1986) 41, 547-555.
- 2) Takeuchi H, Sakagami K, Seki Y, Tsuboi K, Matsumoto T, Miyazaki M and Orita K: Antiidiotypic antibodies and suppressor cells induced by donor-specific transfusion in potential kidney transplant recipients. *Transplant Proc* (1985) 17, 1059-1061.
- 3) Matsumoto T, Sakagami K, Tsuboi K, Osaki T, Takeuchi H, Matsuoka J, Miyazaki M, Seki K, Oiwa K, Sone Y and Orita K: Possible mechanism of donor-specific blood transfusions in prolongation of kidney graft survival. *Transplant Proc* (1985) 17, 2401-2406.
- 4) Matsumoto T, Sakagami K and Orita K: Role of donor specific blood transfusions in prolongation

- of kidney graft survival. *Transplant Proc* (1987) **19**, 2264—2267.
- 5) Haisa M, Sakagami K, Matsumoto T, Kawamura T, Uchida S, Fujiwara T, Shiozaki S, Inagaki M and Orita K : Donor-specific transfusion (DST) with intermittent administration of azathioprine induces suppressor T cells and MLR-inhibiting factors without sensitization. *Transplant Proc* (1989) **21**, 1814—1817.
  - 6) Dorf ME and Benacerraf B : Suppressor cells and immunoregulation. *Annu Rev Immunol* (1984) **2**, 127—158.
  - 7) Wiscoki LJ and Sato VL : “Panning” for lymphocytes : a model for cell selection. *Proc Natl Acad Sci USA* (1978) **75**, 2844—2848.
  - 8) Gillis S, Ferm MM, Ou W and Smith KA : T cell growth factor : parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol* (1978) **120**, 2027—2032.
  - 9) Landay A, Gartland GL and Clement LT : Characterization of a phenotypically distinct subpopulation of Leu-2<sup>+</sup> cells that suppresses T cell proliferative responses. *J Immunol* (1983) **131**, 2757—2761.
  - 10) Damle NK and Engleman EG : Immunoregulatory T cell circuits in man. Alloantigen inducer T cells activate alloantigen-specific suppressor T cells in the absence of the initial antigenic stimulus. *J Exp Med* (1983) **158**, 159—173.
  - 11) Truitt GA, Rich RR and Rich SS : Suppression of cytotoxic lymphocyte responses in vitro by soluble products of alloantigen-activated spleen cells. *J Immunol* (1978) **121**, 1045—1051.
  - 12) Damle NK, Mohagheghpour N, Kansas GS, Fishwild GM and Engleman EG : Immunoregulatory T cell circuits in man : identification of a distinct T cell subpopulation of the helper/inducer lineage that amplifies the development of alloantigen-specific suppressor T cells. *J Immunol* (1985) **134**, 235—243.
  - 13) Koide J and Engleman EG : Differences in surface phenotype and mechanism of action between alloantigen-specific CD 8<sup>+</sup> cytotoxic and suppressor T cell clones. *J Immunol* (1990) **144**, 32—40.
  - 14) Salomon DR, Cohen DJ, Williams JM and Carpenter CB : Feedback suppression of primary rat MLR cannot be bypassed by exogenous interleukin-2. *Transplant Proc* (1983) **15**, 774—775.
  - 15) Susskind BN, Merluzzi VJ, Faanes RB, Palladino MA and Choi YS : Regulatory mechanisms in cytotoxic T lymphocyte development. I. A suppressor T cell subset that regulates the proliferative stage of CTL development. *J Immunol* (1983) **130**, 527—532.
  - 16) Tsuboi K, Sakagami K, Seki Y, Takeuchi H, Tanaka K, Osaki T, Matsuoka J and Orita K : Possible mode of action of suppressor T cells generated in ten-day human allogeneic mixed lymphocyte reaction. *Transplant Proc* (1985) **17**, 696—698.
  - 17) Leivestad T, Flatmark A, Hirschberg H and Thorsby E : Effect of pretransplant donor-specific transfusions in renal transplantation. *Transplant Proc* (1982) **14**, 370—373.
  - 18) Klatzmann D, Gluckman JC, Foucault C, Bensussan A, Assobga U and Duboust A : Suppression of lymphocyte reactivity by blood transfusions in uremic patients I. Proliferative responses. *Transplantation* (1983) **35**, 332—338.
  - 19) Seki Y, Sakagami K, Takeuchi H, Tanaka K, Namba A, Fuchimoto S and Orita K : Evidence for donor-specific cell-mediated lympholysis unresponsiveness and suppressor cells in well functioning kidney transplants. *Transplant Proc* (1983) **15**, 2131—2135.
  - 20) Azuma T, Sato S, Kitagawa S, Hori S, Kokudo S, Hamaoka T and Fujiwara H : Tolerance induction of allo-class I H-2 antigen-reactive Lyt-2<sup>+</sup> helper T cells and prolonged survival of the



- corresponding class I H-2-disparate skin graft. *J Immunol* (1989) **143**, 1—8.
- 21) Hori S, Sato S, Kitagawa S, Azuma T, Kokudo S, Hamaoka T and Fujiwara H : Tolerance induction of allo-class II H-2 antigen-reactive L 3 T 4 + helper T cells and prolonged survival of the corresponding class II H-2-disparate skin graft. *J Immunol* (1989) **143**, 1447—1452.
- 22) Haisa M, Sakagami K and Orita K : Establishment of a human T-cell hybridoma producing an MLR suppressing factor : relationship to the mechanism of action of donor-specific transfusion. *Transplant Proc* (1990) **22**, 1977—1980.
- 23) Haisa M, Sakagami K, Kawamura T, Niguma T, Fujiwara T, Kusaka S, Matsuoka J, Shiozaki S, Fujiwara T, Onoda T and Orita K : Induction of suppressor T cells by donor-specific blood transfusions : establishment of a human T-cell hybridoma producing an MLR suppressant factor. *Transplant Proc* (1991) **23**, 190—199.

**Analysis of suppressor T cells induced in long-term  
human allogeneic mixed lymphocyte culture**

**Katsutoshi TSUBOI**

**First Department of Surgery,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. K. Orita)**

Suppressor T cells (Ts) may play an important role in the regulation of immunological responses. Ts may play a role in the long-term acceptance of an allogeneic organ graft and the beneficial effects of donor-specific blood transfusions on subsequent transplant survival. The population of Ts induced in mixed lymphocyte culture (MLC) was analyzed, and the mechanism underlying the suppressor activity was examined.

The Ts generated in 10-day MLC were found to belong to the OKT8<sup>+</sup> subset and inhibited both mixed lymphocyte reaction (MLR) and cell-mediated lympholysis. These Ts inhibited MLR in an antigen-specific manner, but failed to alter the kinetics of the MLR. Furthermore, these Ts inhibited the production of endogenous interleukin-2 and exerted a suppressive effect only when added early in the culture.

In conclusion, the precise target of Ts generated in 10-day MLC might be the earliest responding T helper clone.