

Lymphokine Activated Killer(LAK)細胞と腫瘍浸潤リンパ球(TIL) のクローンレベルでの機能的多様性の解析

蟹 沢 祐 司 高 後 裕
札幌医科大学内科学第4講座 (主任 新津洋司郎 教授)

Analysis on Functional Heterogeneity of Lymphokine Activated Killer(LAK) Cells and Tumor Infiltrating Lymphocytes(TIL) at the Clonal Level

Yuji KANIZAWA and Yutaka KOHGO
Department of Internal Medicine (Section 4), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. Y. NIITSU)

ABSTRACT We have analyzed interleukin-2 stimulated killer activity derived from peripheral blood lymphocytes (PBL) and tumor infiltrating lymphocytes (TIL) at the clonal level by a limiting dilution technique. The numbers of obtained clones from LAK and TIL were 34 and 78, respectively. The killer activity of these clones was examined against autologous tumor cells and Daudi cells as targets. About half of the PBL and TIL clones showed significant cytotoxicity against autologous tumor and/or Daudi cells. It was noteworthy that the specific cytotoxicity against autologous tumor cells (CTL-Like activity) was observed in 9 of 14 LAK killer clones and in 30 of 41 TIL killer clones. Surface marker analysis indicated that all the CTL-like clones were either CD3⁺4⁺8⁻ or CD3⁺4⁻8⁺, and there was no significant difference in cytotoxicity between them. On the other hand, about half of the LAK and TIL clones had no cytotoxic effect against Daudi and/or autologous tumor cells. On the CTL induction system, these non-killer clones also showed regulatory functions, such as augmentation and suppression. These results suggest that IL-2 activated cells, both from peripheral blood and tumor tissue have not only a direct cytotoxic activity, but also an indirect helper function which was mediated by regulatory T cell. (Received December 27, 1990 and accepted January 18, 1991)

Key words: Lymphokine activated killer cells, Tumor infiltrating lymphocytes
Killer clone, Non-killer clone, Regulatory T cell clone.

1 緒 言

Interleukin 2 (IL-2) は末梢血リンパ球 (PBL) や腫瘍組織浸潤リンパ球 (TIL) を活性化, 増殖させ, 自己腫瘍細胞を含む多くの腫瘍細胞に細胞障害活性を示すキラー細胞を誘導する¹⁻³⁾. このうち PBL 由来のIL-

2 活性化細胞は Lymphokine activated killer (LAK) 細胞と呼ばれ, その性状について精力的に解析が行なわれてきたにもかかわらず, これまでのところ不明な点も少なくない. 当初, Natural killer (NK) 細胞が唯一の前駆細胞と考えられた時期があったが⁴⁾, Grimm *et al.* が補体結合反応を用いた negative

Abbreviations

LAK : Lymphokine activated killer cells
TIL : Tumor infiltrating lymphocytes
CTL : Cytotoxic T lymphocytes

IL-2 : Interleukin 2
MLTC : Mixed lymphocyte tumor culture

selection による検討から non T かつ non NK 細胞に LAK 前駆細胞があることを報告して以来⁵⁾, その多様性が示唆されるようになった. その後, セルソーターを用いた positive selection の手法が導入され, CD16 陽性 NK 細胞⁶⁾, CD3 陽性 T 細胞⁷⁾ など多様な細胞がエフェクターとなることが示された. また IL-2 活性化細胞は標的細胞特異性がなく, major histocompatibility complex (MHC) 非拘束性の非特異的なキラー細胞と考えられてきたが, 最近になって, 癌患者 PBL より自己腫瘍特異的な cytotoxic T lymphocyte (CTL) クローンが単離可能なこと⁸⁻¹⁰⁾, 更に悪性黒色腫患者 TIL も IL-2 存在下で長期培養することにより, 自己腫瘍特異的な性格を有するようになることが報告され¹¹⁾, LAK, TIL 中に CTL が混在すると考えられるようになってきている.

しかし一方で LAK, TIL など IL-2 で活性化したリンパ球の中にはキラー活性をもつ細胞が全体の一部にしか存在しないことが報告され^{12,13)}, 非キラー細胞の存在も示されるようになってきた. 事実, 野尻らは LAK 細胞を移入する養子免疫療法有効例を解析した結果, 効果発現までに LAK 細胞投与後, 数週間と長時間を要することから, IL-2 活性化細胞には間接的な抗腫瘍効果がある可能性を推定した¹⁴⁾. さらに動物実験に於いて LAK 細胞は宿主リンパ球の腫瘍内浸潤を増強することが報告されている¹⁵⁾. つまり IL-2 活性化細胞には直接的抗腫瘍効果ばかりでなく, 宿主の免疫反応を介した間接的抗腫瘍効果も有すると推定されるに至っている.

そこで筆者らはヒトでの IL-2 活性化細胞の多様性を解明するため, LAK, TIL を限界希釈法によりクローニングを行ない, キラークローンの同定を試みた. また, キラー活性を有しない非キラークローンがいかなる機能をもつのか, CTL 誘導系に対する作用の面から検討したので報告する.

2 方 法

2.1 対 象

札幌医科大学第四内科に入院した癌性腹膜炎ないし胸膜炎を併発した 9 名の進行癌患者を対象とした. 内訳は胃癌, 大腸癌が各 3 名, 肺小細胞癌, 肺腺癌, 胆管癌患者が各 1 名であり, 平均年齢は 63.0±11.1 歳であった (Table 1).

2.2 末梢血単核球, 腫瘍浸潤リンパ球の採取法

癌患者より末梢血および癌性胸腹水をヘパリン加で採取し, Böyum の方法¹⁶⁾に従い, 50ml のプラスチック

Table 1 List of patients

case	age	sex	diagnosis	source of TIL
1	73	F	colon cancer	ascites
2	59	F	colon cancer	ascites
3	48	F	gastric cancer	ascites
4	64	M	gastric cancer	ascites
5	72	F	colon cancer	ascites
6	75	M	lung cancer	pleural effusion
7	67	M	gastric cancer	ascites
8	43	M	lung cancer	pleural effusion
9	66	M	cholangiocarcinoma	ascites

試験管 (Falcon 2070) 内の Ficoll-Isopaque 液 (Ficoll 57. 24g/l, Pharmacia, Sweden; Isopaque 108. 69ml/l 鳥居薬品) に重層し, 室温で 400×g, 30 分間遠心した. 遠心後, 単核球層を回収し, 滅菌生理塩水で 2 回洗浄した.

癌性胸腹水中の単核球は更に以下の操作を行ない, 腫瘍浸潤リンパ球と腫瘍細胞に分離した. 即ち, RPMI 1640 培養液 (GIBCO, USA) で希釈し作成した 60% 及び 40% Percoll (1.130g/ml, Pharmacia) を 15ml プラスチック試験管 (FALCON 2097) に各々 4ml ずつ重層した後, RPMI 1640 に浮遊させた単核球 3ml を重層し, 室温で 400×g, 30 分間遠心し, 下層の腫瘍浸潤リンパ球, 上層の腫瘍細胞にわけ回収した. この腫瘍細胞及び, TIL の純度はいずれも 90% 以上であった. また腫瘍細胞は細胞障害活性の測定を行なうまでプログラムフリーザー (Model 1010, CRYOMED Co.) で凍結し, 液体窒素中で保存した.

2.3 LAK, TIL クローンの作製法

癌患者末梢血および癌性胸腹水からの LAK, TIL クローンの作製法を Fig. 1 に示す.

培養には ampicillin 60µg/ml, kanamycin 60µg/ml を加えた RPMI 1640 培地に 10% Fetal Calf Serum (以下 FCS と略す. Flow, USA) を添加して用いた. 尚, FCS は, あらかじめ 56°C, 30 分間非働化したものを用いた. ヒト遺伝子組み換え IL-2 (rIL-2, TGP-3) は武田薬品工業株式会社より供与をうけた. その比活性は 3.5×10⁴ unit/mg protein であり, 1 unit は 342 NIH-BRM unit に相当する.

IL-2 で分離した末梢血単核球及び腫瘍浸潤リンパ球を, 10% FCS 加 RPMI 1640 培地で 1×10⁶/ml の細胞濃度に調整し, 2 unit/ml の rIL-2 存在下, 37°C, 5%CO₂ の状態で 7 日間培養後, 生細胞を回収した. 培

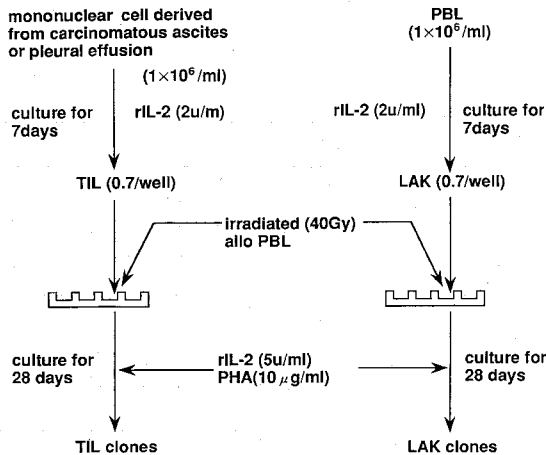


Fig. 1 Method for cloning of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and LAK cells.

養開始後、3日目、5日目に rIL-2 をそれぞれ 2 unit/ml となるように添加した。

回収した LAK, TIL より, Moretta *et al.*¹⁹⁾の方法に準じ限界希釈を行ない LAK, TIL のクローンを作製した。即ち、1 ウェル当たり 0.7 個となるように、LAK, TIL を希釈した後 96 穴マイクロタイタープレート (FALCON 3072) に分注し、X 線照射装置 (Model 150, Softex Co.) で 40 Gy の X 線を照射したアロ末梢単核球 (1×10^6 /ml) をフィーダー細胞とし、phytohemagglutinin (PHA, GIBCO) $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, 5 unit/ml の rIL-2 存在下に、2 週間培養した。増殖の認められたクローンを選択し 24 穴培養プレート (FALCON 3047) に移し、更に 2 週間、同培地中で培養した。

2.4 フローサイトメーター

回収された LAK, TIL クローンの表面抗原を蛍光標識モノクローナル抗体を用いて、Spectrum III (Ortho diagnostic systems) により測定した。FITC 標識 anti-CD3 (OKT3), -CD4 (OKT4), -CD8 (OKT8) は Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ. より、anti-CD16 (Leull), anti- α , β TCR heterodimer (clone WT31) は Becton Dickinson, Mountain View, CA. より購入、使用した。

2.5 細胞障害活性測定法

各クローンの細胞障害活性の測定には、標的細胞として Burkitt's lymphoma 由来の Daudi 細胞と、あらかじめ癌性胸腹水より分離、凍結保存しておいた新鮮自己腫瘍細胞を用い、 ^{51}Cr release 法で測定した。即ち、Daudi 細胞、自己腫瘍細胞を 10% FCS 加 RPMI 1640 培地で 4×10^6 /ml に調整後、細胞浮遊液 0.5 ml に 3.7 MBq の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (specific activity 37 MBq/

mg, 第一ラジオアイソトープ研究所) を添加し、 37°C , 5% CO_2 下で 90 分間培養した。滅菌生理食塩水にて 3 回洗浄後、細胞数を 5×10^4 /ml に調整し、 ^{51}Cr 標識標的細胞とした。エフェクター細胞、即ち LAK 及び TIL クローンを 5×10^5 /ml に調整し、エフェクター細胞/標的細胞 (E/T) 比は 10:1 とし両者を 96 穴マイクロタイタープレートに混合し 4 時間の ^{51}Cr release assay 法により細胞障害活性を測定した。尚 % cytotoxicity は次式より算出した。

細胞障害活性 (%) =

$$\frac{\text{実験解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}}{\text{最大解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}} \times 100$$

2.6 腫瘍細胞リンパ球混合培養 (Mixed Lymphocyte Tumor Culture, MLTC) による自己腫瘍特異的キラー (Cytotoxic T lymphocyte, CTL) の誘導法

肺小細胞癌および、肺腺癌患者胸水中のリンパ球 (1×10^6 /ml) とあらかじめ 40 Gy の X 線照射をした自己腫瘍細胞 (5×10^3 /ml) を混合し、rIL-2 (2 units/ml) 存在下に 7 日間培養し MLTC キラーを誘導した。このキラー細胞の細胞障害活性を自己腫瘍細胞、及び Daudi 細胞を標的として ^{51}Cr release 法で測定した。

キラー細胞の MHC 抗原による拘束性の確認は、cold target inhibition test, 及び単クローン抗体による blocking test により行なった。即ち、標識自己腫瘍細胞 (5×10^4 /ml), Daudi 細胞 (5×10^4 /ml) と非標識自己腫瘍細胞 (5×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 /ml) を混合した後、エフェクター細胞 (1×10^6 /ml) を加え、4 時間培養後の細胞障害活性を測定し、対照と比較した。また、blocking test は標的となる自己腫瘍細胞 (1×10^6 cells/500 μl) に抗 HLA-A, B, C 抗体 (Becton Dickinson Co. Mountain View, CA) を 10 μl を加え、 4°C 30 分間処理した後、MLTC キラー細胞をエフェクターとし、4 時間の ^{51}Cr release 法にて細胞障害活性を測定した。

更に、MLTC キラー誘導系にあらかじめ 40 Gy の X 線を照射した非キラークローンを 5×10^4 /ml となるように加え、Fig. 2 に示すように IL-2 (2 unit/ml) 存在下で 7 日間培養後、自己腫瘍細胞を標的として、細胞障害活性を測定し照射と比較した。

2.7 推計学的検定法

クローン形成率、細胞障害活性の推計学的検定は Student's "t" test または Wilcoxon's "U" test で行なった。

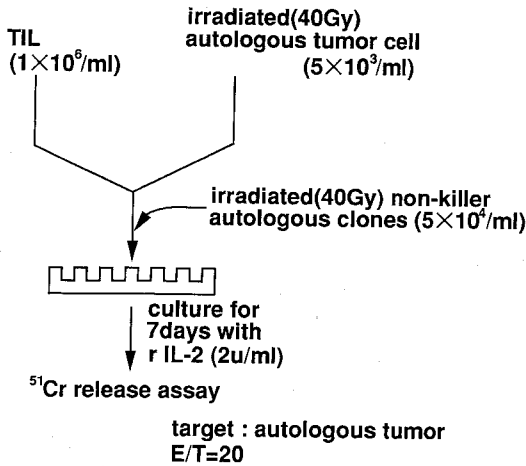


Fig. 2 Method for evaluation on regulatory function by non-killer clones. Irradiated non-killer clones were added to MLTC. After 7 days culture with IL-2, cytotoxic activities against autologous tumor cells were measured by ^{51}Cr release assay.

3 結 果

3.1 LAK, TIL クロンの形成率および性状解析

9 症例から LAK 34 個, TIL 78 個のクローンが回収された。クローン形成率は LAK $1.9 \pm 1.3\%$, TIL $4.3 \pm 2.9\%$ であり, 推計学的な有意差は認められなかった。

これらのクローンの表面抗原を Table 2 に示すが, LAK, TIL クローンとも全て CD3 陽性, CD16 陰性であった。このうち CD4⁺8⁻ クローンは LAK で 19 個 (55.9%), TIL が 48 個 (61.5%) であり, CD4⁻8⁺ クローンは LAK 15 個 (44.1%), TIL 30 個 (38.5%) であった。また TCR $\alpha\beta$ 鎖複合体である WT-31 は検討した LAK 11 クローン, TIL 19 クローンで全例陽性であった。

3.2 LAK, TIL クロンの細胞障害スペクトラム

LAK, TIL クロンの Daudi 細胞, 自己腫瘍細胞に対する細胞障害能を Table 3 に示す。

Daudi あるいは自己腫瘍に対し細胞障害活性を示すクローンは LAK で 14 個 (41.2%), TIL で 41 個 (52.6%) であった。これに対しいずれの標的細胞にも細胞障害活性を示さない非キラークローンは LAK 20 個 (58.8%), TIL 37 個 (47.4%) 存在した。

LAK 14 個, TIL 41 個のキラークローンのうち, Daudi 細胞に対してのみ細胞障害活性を示すクローン

Table 2 Proportion of lymphocyte subpopulations of LAK and TIL clones

	LAK clone	TIL clone
CD 3 ⁺ *	34/34 (100%)	78/78 (100%)
CD 4 ⁺ 8 ⁻	19/34 (55.9%)	48/78 (61.5%)
CD 4 ⁻ 8 ⁺	15/34 (44.1%)	30/78 (38.5%)
CD 16 ⁺	0/34 (0.0%)	0/78 (0.0%)
WT 31 ⁺	11/11 (100%)	19/19 (100%)

Surface antigen expression was analyzed by spectrum III. Fluorescence distribution was uniform, and virtually 100% of cells of each clone were either positive or negative for single antigen.

Table 3 Heterogeneity of cytotoxic activity exhibited by LAK and TIL clones

Effector cell	Cytotoxicity for		Number of clones
	Autologous tumor cell	Daudi cell line	
LAK clone	+	-	9 (26.5%)
	+	+	4 (11.8%)
	-	+	1 (2.9%)
	-	+	20 (58.8%)
TIL clone	+	-	30 (38.5%)
	+	+	9 (22.5%)
	-	+	9 (2.6%)
	-	-	37 (47.4%)

Results were expressed as below.

(+): referred to the cytotoxicity more than 10% of specific ^{51}Cr release. (-): less than 10% of specific ^{51}Cr release.

は LAK で 1 個, TIL で 2 個であり, 自己腫瘍細胞に対してのみ細胞障害活性を示すクローンは LAK で 9 個, TIL 30 個を占め, Daudi 細胞と自己腫瘍細胞の両者に対し細胞障害活性を示すクローンは LAK 4 個, TIL 9 個であった。

3.3 自己腫瘍障害クローンの表面抗原及び細胞障害活性

Table 4 に自己腫瘍細胞にのみ細胞障害活性を示す LAK 9 個, TIL 30 個のキラークローンの細胞障害活性と細胞表面抗原を示す。LAK 9 個, TIL 30 個のキラークローンの細胞障害活性は, LAK クローン $19.1 \pm 12.6\%$ であるのに対し TIL クローンでは $20.6 \pm 13.0\%$ と TIL クローンがやや高い値を示していたが, 推計学的な有意差は認められなかった。

これらキラークローンの表面マーカーを解析すると,

Table 4 Cytotoxicity and phenotypic proportion of LAK and TIL clones using fresh autologous tumor cells as target

	LAK	TIL
Mean % cytotoxicity ^a	19.1±12.6 ^b	20.6±13.0
Number of		
CD3 ⁺ 4 ⁺ 8 ⁻ clone	3 (33.3%)	15 (50.0%)
CD3 ⁺ 4 ⁻ 8 ⁺ clone	6 (66.7%)	15 (50.0%)
Mean % cytotoxicity of		
CD3 ⁺ 4 ⁺ 8 ⁻ clone	26.6±19.5	17.2± 9.4
CD3 ⁺ 4 ⁻ 8 ⁺ clone	15.3± 7.1	24.0±15.4
] N. S. ^c] N. S.

^a) Cytotoxicity was measured by 4-h ⁵¹Cr release assay at 10:1 E/T ratio.

^b) Data were expressed as % cytotoxicity ± S. D.

^c) N. S. : not significant

LAK, TIL クローンとも CD3⁺4⁺8⁻ と CD3⁺4⁻8⁺ の 2 つのグループに大別された。CD4⁺クローンと CD8⁺クローンの頻度は LAK, TIL では異なり, LAK では CD8⁺クローンが 66.7% と優位であり, TIL では CD4⁺クローンと CD8⁺クローンが同数認められた。

この CD4 陽性と CD8 陽性, 2 つのキラークローンの自己腫瘍細胞に対する細胞障害活性は, LAK, TIL とともに, ほぼ同等で有意差は認めなかった。

3・4 CTL 誘導に及ぼす自己非キラークローンの補助機能の解析

自己腫瘍細胞と IL-2 存在下で 7 日間, 混合培養し得たキラー細胞の自己腫瘍細胞, Daudi 細胞に対する細胞障害活性は, Table 5 で示すように実験 1 でそれぞれ, 25.6%, 56.6%, 実験 2 で 41.4%, 75.2% と, 両者に対して認められた。

そこでこれらキラー細胞の自己腫瘍細胞特異性を確認するため, cold target inhibition test を行ったところ, Table 5 に示すように Daudi 細胞に対する細胞障害活性は cold target 存在下でも, 殆んど変化がないのに対し, 自己腫瘍細胞に対する細胞障害活性は, 25.6% から 8.5%, 41.4% から 14.3% へと低下していた。これら自己腫瘍細胞は共に class I 抗原 (HLA-A, B, C) が 98.8%, 97.2% と強陽性であることから, 過量の抗 class I 抗体 (HLA-A, B, C) で標的細胞のブロックを行なうと, Table 6 に示すように 25.6% から 2.7%, 41.4% から 11.0% へと著明な低下が認められた。即ち MLTC で誘導されるキラー細胞は, 標的細胞の認識に MHC class I 抗原が関与し, CTL としての性格を有しているものと考えられた。

この CTL 誘導系に対し, 非キラークローンを添加し,

Table 5 Cold target inhibition assay on the lysis of fresh autologous tumor cells by MLTC

cold target	cold : hot target ratio	hot target	
		Autologous tumor cell	Daudi cell
Exp. 1			
		25.6% ^c	56.6%
autologous ^a	1 : 1	18.4%	55.5%
tumor cell	2 : 1	14.0%	57.1%
	4 : 1	8.5%	52.0%
Exp. 2			
		41.4%	75.2%
autologous ^b	1 : 1	30.6%	77.1%
tumor cell	2 : 1	21.8%	73.6%
	4 : 1	14.3%	69.2%

^a) lung adenocarcinoma

^b) lung small cell cancer

^c) Cytotoxicity was measured by 4-h ⁵¹Cr release assay at effector / cold target / hot target ratios of 20:1:1, 20:2:1 and 20:4:1. Data were expressed as % cytotoxicity.

その影響を検討した。Table 7 に示した通り, CD4 陽性の非キラークローンである 6-B, 8-A, 4-A, 4-B では CTL 活性を対照の 1.2 倍から 2.5 倍に増強していた。一方, 8-C, 8-B, 4-C, 4-D のクローンは CTL 活性をほぼ完全に抑制していた。

4 考 察

LAK 細胞をはじめとして IL-2 活性化細胞の構成細胞に関する研究は主としてキラー細胞に注目して行わ

Table 6 Inhibition assay of MoAb to autologous tumor cell

	anti HLA-A, B, C ^{a)} treatment	cytotoxicity ^{b)}
Exp. 1	(+)	25.6%
	(-)	2.7%
Exp. 2	(-)	41.4%
	(+)	11.0%

^{a)} Autologous tumor cells were treated with MoAb at 4°C for 30 min.

^{b)} Data were expressed as % cytotoxicity.

れてきた。即ち、negative selection や positive selection を用いた検討から NK 細胞と T 細胞由来のキラー細胞の存在が証明されるなどキラー細胞だけをとりも複数の細胞集団から構成されることが判明している⁵⁻⁷⁾。またキラー細胞誘導の他に IL-2 にはサブプレッサー細胞の誘導、血管内皮障害細胞の誘導などの作用が報告され^{17,18)}、IL-2 活性化細胞には極めて多様な細胞群が含まれると推定されるに至っている。したがって、LAK, TIL を用いた養子免疫療法を行なううえで、実際に我々が扱っている細胞がどのようなものであるか、正確に把握することは臨床効果の解析や治療成績向上を目指すうえで必須であると考えられる。このため IL-2 活性化細胞の厳密な解析が必要であるが、従来

の bulk culture ではたとえ、sorting の手法を用いても複数の細胞集団の総体を検討することになるのは避けられず限界があった。

Moretta *et al.*¹⁹⁾により開発された限界希釈法は PHA と IL-2 の存在により健康人リンパ球のクローンを効率よく形成し、bulk culture では不可能な細胞 1 個 1 個のレベルでリンパ球の機能を *in vitro* で検討できる手段である。そこで筆者らは IL-2 活性化細胞中に含まれるキラー細胞と非キラー細胞の比率を確認するため、この限界希釈法を用いて LAK, TIL クローンを作製し、クローンレベルで解析を試みた。その結果、LAK クローンの約 40%、TIL クローンの約 50% がキラークローン、残りが非キラークローンであることが確認された。

このキラークローンは全て CD3 陽性の T 細胞 lineage であり、CD3⁺4⁺8⁻クローンと CD3⁺4⁻8⁺クローンの 2 種類に大別され、LAK では CD8 陽性クローンが優位で TIL では CD4 陽性クローンと CD8 陽性クローンが同頻度であることが明らかとなった。これまでの negative selection あるいは positive selection を用いた検討から LAK では CD8 陽性細胞が主なエフェクターであり²⁰⁾、TIL では CD8 陽性細胞と CD4 陽性細胞の両者がエフェクターと推定されているが^{21,22)}、筆者らのクローンレベルでの解析結果はこれを裏付けるものと考えられる。

しかし IL-2 活性化キラー細胞で、非特異的キラー細胞である CD3⁻CD16⁺NK 細胞クローン^{23,24)}や、CD3⁺4⁻

Table 7 The effect of irradiated non-killer clones on the CTL activities

patient number	added clone number (surface marker)	% specific lysis	relative cytotoxicity
case 6	none	25.7%	—
	6-A (CD8)	18.8%	73.2%
	6-B (CD4)	65.0%	253.0%
case 8	none	30.4%	—
	8-A (CD4)	39.1%	128.6%
	8-B (CD4)	27.5%	90.5%
	8-C (CD4)	4.1%	13.5%
	8-D (CD8)	31.4%	103.3%
	8-E (CD8)	0.0%	0.0%
case 4	none	39.5%	—
	4-A (CD4)	48.7%	123.3%
	4-B (CD4)	53.0%	134.2%
	4-C (CD4)	3.6%	9.1%
	4-D (CD4)	0.0%	0.0%

8-WT31-クローン^{25,26)}は認められなかった。この原因としては CD3⁺4⁻8⁻WT31⁺細胞はもともと極めて少数であること²⁷⁾、またあらかじめ高濃度の IL-2 存在下で PBL や TIL を培養した後で限界希釈を行ったため、NK-LAK が少数であった可能性があげられよう。

次にキラークロンの細胞障害スペクトラムを検討した結果、自己腫瘍細胞に対してのみキラー活性を示し、Daudi 細胞にキラー活性を示さないクローンが LAK で 9 個(65.3%)、TIL で 30 個(73.1%)を占め、LAK、TIL とも非特異的なキラークロンを凌駕することが明らかとなった。

この自己腫瘍特異的なキラークロンは全て CD3⁺4⁻8⁻ないし CD3⁺4⁺8⁻であり、いわゆる古典的キラー T 細胞の性状を呈していた^{28,30)}。この結果は TIL のみならず末梢血からも自己腫瘍特異的なキラー細胞が誘導できる可能性を示し、臨床面からも注目される。このキラー細胞が実際に MHC 拘束をうけるかどうかは今後の検討課題であるが、動物実験では P-815 mastocytoma 細胞移植後、脾細胞やリンパ節中に CTL が出現することが報告されており³¹⁾、ヒト PBL も自己癌細胞に感作をうけている可能性も考えられた。

前述した通り、TIL や LAK 細胞中には自己腫瘍特異的なキラーが存在することが明らかとなったが、この TIL、LAK 細胞を移入する養子免疫療法の奏効率は当初の予想より数段、低いのが現状である。このためより特異性の高いキラー細胞として MLTC により誘導した CTL を利用する CTL 療法が考案されている³²⁾。本法での投与細胞数は極めて少数であるにもかかわらず、奏効率は大量の LAK 細胞移入と同等の効果が得られることが報告されている。しかし stimulator として用いる自己癌細胞を大量に入手することは難しく、継続的な治療に困難をきたすことがまれではない。従ってこの CTL の増殖、キラー活性の増強が *in vivo* で可能であれば、CTL 療法の欠点を克服できるものと考えられる。

さらに最近になり、動物実験において IL-2 活性化細胞には宿主免疫応答を介する間接的抗腫瘍効果もあることが報告され³⁴⁾、野尻らも養子免疫療法有効例を解析した結果、LAK 細胞投与後、長時間を経過してはじめて効果が認められることを指摘し¹⁴⁾、IL-2 活性化細胞のもつ間接的効果の重要性が注目を集めている。また、Ksander *et al.* は p-815 移植マウス腫瘍局所には CTL 前駆細胞 (precursor cytotoxic T cell, pTc) が多数認められるものの、サブレッサー T 細胞機能の亢進、ヘルパー T 細胞機能の低下により *in vivo* では

pTc から十分な細胞障害能を有する CTL が分化しえない可能性も報告している³³⁾。そこで筆者らは、その生理的機能がいまだ不明な非キラークローンに注目し、CTL 誘導に対する作用の面から検討を行った。

その結果、CD4 陽性非キラークローンのうちあるもの (6B, 8A, 4A, 4B) は CTL 活性を著明に増強させることが明らかとなった。即ち、生体内において、IL-2 活性化非キラークローンの一部は CTL 誘導を増強し、間接的抗腫瘍効果を発揮する可能性が示唆された。この CTL 誘導能を持つヘルパー細胞を利用すれば強力で特異性の高いキラー細胞を誘導可能であり、養子免疫療法の効果増強に寄与すると考えられる。しかし一方では CTL 活性をほぼ完全に抑制するサブレッサークローン (8C, 8E, 4C, 4D) の存在も確認され、IL-2 活性化細胞移入による癌免疫療法施行の上で、解決すべき点が多いことが示された。

以上の IL-2 活性化細胞のクローン解析の結果から、従来非特異的なキラー細胞と考えられていた LAK、TIL には自己腫瘍特異的な CTL 様のクローンが少なからず存在することが明らかとなった。さらに非キラークローンのうちあるものは宿主 CTL の誘導を促す間接的抗腫瘍効果を有することが示された。これらのクローンレベルでの解析は単に養子免疫療法の機序に解答を提示するのみならず、CTL の誘導を目指す免疫療法を確立するうえでも重要な情報となるものと考えられる。

5 結 論

IL-2 活性化細胞のクローン解析を行なった結果、以下の諸点が明らかとなった。

1. LAK クローンの約 40%、TIL クローンの約 50% がキラークローンであり、残りは非キラークローンであった。これらの細胞は全て CD3 陽性、CD16 陰性の T 細胞であった。
2. キラークローンの半数以上は自己腫瘍細胞に特異的に細胞障害活性を示した。この自己腫瘍特異的なクローンは TIL のみならず LAK からも誘導可能であった。
3. 自己腫瘍特異的なキラークローンは CD3⁺4⁻8⁻と CD3⁺4⁺8⁻の 2 種類があるが、両者の細胞障害活性に有意の差は認められなかった。
4. LAK、TIL クローンの過半数を占める非キラークローンのうちには、MLTC により誘導される CTL 活性を増強あるいは低下させる機能を有していた。

以上のクローン解析により得られた結果は担癌患者で抗腫瘍効果を担う細胞群を直接、明らかにすると

ともに, CTL 誘導を介する間接的抗腫瘍効果を説明しうるものである。

稿を終えるにあたり, 御指導並びに御校閲下さった本学内科学第 4 講座, 新津洋司郎教授に深く感謝いたします。また研究に際して御協力いただきました笹川裕博士, 坂牧純夫博士をはじめとする教室員各位に感謝いたします。

尚, 本研究の一部は厚生省がん研究助成「サイトカインの作用機構と臨床応用に関する研究班」(高後)により行なわれた。

文 献

- Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, Z. H. and 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).
- Grimm, E. A., Robb, R. J., Roth, J. A., Necker, L. A., Lachman, L. B., Wilson, D. J. and Rosenberg, S. A.: Lymphokine activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine activated killer cells. *J. Exp. Med.* **158**, 1356-1362 (1983).
- Rosenberg, S. A., Spiess, P. and Latreniere, R.: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* **233**, 1318-1821 (1986).
- Kuribayashi, K., Gillis, S., Kern, D. E. and Henney, C. S.: Murine NK cell cultures: Effect of interleukin-2 and interferon on cell growth and cytotoxic reactivity. *J. Immunol.* **126**, 2321-2327 (1981).
- Grimm, E. A., Ramsey, K. M., Wilson, D. J., Djeu, J. Y. and Rosenberg, S. A.: Lymphokine activated killer cell phenomenon. II. Precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory cytotoxic thymus-derived lymphocytes and NK cells. *J. Exp. Med.* **157**, 884-897 (1983).
- Itoh, K., Tilden, A. B. and Balch, C. M.: Lysis of human tumor cells by lymphokine-activated natural killer cells. *J. Immunol.* **136**, 3910-3915 (1986).
- 蟹沢祐司, 高後 裕, 笹川 裕, 野尻秀一, 上野芳経, 信太 治, 伊藤克礼, 新津洋司郎, 漆崎一朗: Cell sorter を用いて分取した IL-2 activated killer 細胞の多様性. *医学のあゆみ* **141**, 949-950 (1987).
- Itoh, K., Platsoucas, C. D. and Balch, C. M.: Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. -Activation of interleukin 2 and autologous tumor cells, and involvement of the T cell receptor-. *J. Exp. Med.* **168**, 1419-1441 (1988).
- Vries, J. E. and Spits, H.: Cloned human cytotoxic T lymphocyte (CTL) lines reactive with autologous melanoma cells. *J. Immunol.* **132**, 510-519 (1984).
- Sato, T., Sato, N., Takahashi, S., Koshiba, H., and Kikuchi, K.: Specific cytotoxicity of a long-term cultured T cell clone on human autologous mammary cancer cells. *Cancer Res.* **46**, 4684-4389 (1986).
- Topalian, S. L., Solomon, D. and Rosenberg, S. A.: Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J. Immunol.* **142**, 3714-3725 (1989).
- Peace, D. J., and Cheever, M. A.: Toxicity and therapeutic efficacy of high-dose interleukin-2. *J. Exp. Med.* **169**, 161-173 (1989).
- Sondel, P. M., Hanks, J., Kohler, P. C., Chen, B. P., Minkoff, D. Z., and Molenda, J. A.: Destruction of autologous human lymphocytes by interleukin-2 activated cytotoxic cells. *J. Immunol.* **137**, 502-511 (1986).
- 野尻秀一, 高後 裕: 進行癌患者に対する Cyclophosphamide 併用養子免疫療法の検討. *札幌医誌* **59**, 5-11 (1990).
- Yamaki, T., Ibayashi, Y., Nakamura, T., Shijubo, N., Daibo, M., Kawahara, T. and Hashi, K.: Immunotherapy of solid tumor by intratumoral infusion of lymphokine-activated killer cells. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **79**, 903-908 (1988).
- Böyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21 (Suppl. 97)**, 77-89 (1968).
- Hirohata, S., Davis, L. S. and Lipsky, P. E.: Role of IL-2 in the generation of CD4⁺ Suppressors of human B cell responsiveness. *J. Immunol.* **142**, 3104-3112 (1989).
- Damle, N. K. and Doyle, L. V.: IL-2 activated human killer lymphocytes but their secreted products mediate increase in albumin flux across cultured endothelial monolayers. Implications for vascular leak syndrome. *J. Immunol.* **142**, 2660-2669 (1989).

19. Moretta, A., Pantaleo, G., Moretta, L., Cerottini, J. H. and Mingari, M. C.: Direct demonstration of clonogenic potential of every human peripheral blood T cell. Clonal analysis of HLA-DR expression and cytotoxic activity. **J. Exp. Med.** **157**, 743-754 (1983).
20. Dianzani, V., Zarccone, D., Pistoia, V., Grossi, C. E., Pileri, A., Massaia, M. and Ferrarini, M.: CD8⁺ CD11b⁺ peripheral blood T lymphocytes contain lymphokine-activated killer cell precursors. **Eur. J. Immunol.** **19**, 1037-1044 (1989).
21. Mull, L. M., Spiess, P. J., Director, E. P. and Rosenberg, S. A.: Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. **J. Immunol.** **138**, 989-997 (1987).
22. Okada, Y., Yahata, G., Takeuchi, S., Seidoh, T. and Tanaka, K.: A correlation between the expression of CD8 antigen and specific cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes. **Jpn. J. Cancer Res.** **80**, 249-256 (1989).
23. Gerosa, F., Tommasi, M., Spiazzi, A. L., Azzolina, L. S., Carra, G., Maffei, A., Accolla, R. S. and Tridente, G.: Heterogeneity of lymphokine-activated killer (LAK) populations at the clonal level: Both NK and CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ clones efficiently mediate tumor cell killing. **Clin. Immunol. Immunopathol.** **49**, 91-100 (1988).
24. Ferrini, S., Miescher, S., Zocchi, M. R., Fliedner, V. and Morretta, A.: Phenotypic and functional characterization of recombinant interleukin 2 (rIL-2)-induced activated killer cells: Analysis at the population and clonal levels. **J. Immunol.** **138**, 1297-1302 (1987).
25. Moingeon, P., Jitsukawa, S., Faure, F., Troalen, F., Triebel, F., Graziani, M., Forestier, F., Bellet, D., Bohuon, C. and Hercend, T.: A γ -chain complex forms a functional receptor on cloned human lymphocytes with natural killer-like activity. **Nature** **325**, 723-726 (1987).
26. Koide, J., Rivas, A. and Engleman, E. G.: Natural killer(NK)-like cytotoxic activity of allospecific T cell receptor- $\gamma\delta$ ⁺ T cell clones: Distinct receptor-ligand interactions mediate NK-like and allospecific cytotoxicity. **J. Immunol.** **142**, 4162-4168 (1989).
27. Jitsukawa, S., Faure, F., Lipinski, M., Triebel, F. and Hercend, T.: A novel subset of human lymphocytes with a TCR gamma complex. **J. Exp. Med.** **166**, 1192-1197 (1987).
28. Meuer, S. C., Hodgson, J. C., Cooper, D. A., Hussey, R. E., Fitzgerald, K. A., Schlossmann, S. F. and Reinherz, E. L.: Human cytotoxic T cell clones directed at autologous virus-transformed targets: further evidence for linkage of genetic restriction to T4 and T8 surface glycoproteins. **J. Immunol.** **131**, 186-190 (1983).
29. Jacobson, S., Richert, J. B., Biddison, W. E., Satinsky, A., Harzemann, R. J. and McFarland, H. F.: Measles virus-specific T4⁺ human cytotoxic T cell clones are restricted by class II HLA antigens. **J. Immunol.** **133**, 754-757 (1984).
30. Crowley, N. J., Slingsluff, C. L., Darrow, T. L. and Seigler, H. F.: Generation of human autologous melanoma-specific cytotoxic T-cell using HLA-A2-matched allogeneic melanomas. **Cancer Res.** **50**, 492-498 (1990).
31. Ksander, B. R. and Streilein, J. W.: Analysis of cytotoxic T cell responses to intracameral allogeneic tumors. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** **30**, 323-329 (1989).
32. 橋川桂三: CTL療法の基礎と臨床. **Biotherapy** **3**, 629-637 (1989).
33. Ksander, B. R. and Streilein, J. W.: Failure of infiltrating precursor cytotoxic T cells to acquire direct cytotoxic function in immunologically privileged sites. **J. Immunol.** **145**, 2057-2063 (1990)

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学第4内科 蟹沢祐司