The Induction of the Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) against Human Autologous Gastrointestinal Cancer Cells by the In Vitro Sensitization (IVS) System

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/2297/8259

金沢大学十全医学会雑誌　第100巻　第2号　243－255（1991）

生体外培養刺激系を用いた自家消化器癌特異的細胞傷害性T細胞の誘導

金沢大学がん研究所外科部（主任：磨伊正義教授）
表　和　彦

（平成3年2月6日受付）

現在，ナチュラルキラー細胞 (natural killer cells, NK) およびリンホカイン活性化キラー細胞 (lymphokine activated killer cells, LAK) が臨床応用されているが，これらの細胞の腫瘍細胞に対する細胞傷害活性は特異的ではないと一般に考えられている．一方，特異的細胞傷害性T細胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL) は腫瘍細胞特異的で，しかも LAK 細胞より高い細胞傷害活性を有することから，CTL 療法は胃癌，大腸癌患者に対する有効な養子免疫療法になりうると期待されている．そこで本研究では，CTL を生体外培養刺激系 (in vitro sensitization, IVS) で誘導し，NK および LAK 細胞による細胞傷害活性と CTL 細胞による細胞傷害活性の性状の相違を明確にするとともに，CTL 誘導の至適培養条件を求めることを目的とした．まず刺激細胞として LAK では傷害されない非自己ヒトリンパ球を用いるリンパ球混合培養法 (mixed lymphocyte culture, MLC) を CTL 誘導のモデルとし検討した．予備実験で，遺伝子組換え型インターロイキン2 (recombinant interleukin-2, rIL-2) を 1000u/ml の濃度で培養6日目に添加すると効果的に CTL が誘導されることが分かった．また細胞傷害活性が高値を示すのに要する培養日数は，NK 活性および LAK 活性と CTL 活性との間に明らかな差異を認め，CTL 誘導を効果的に行うには25～30日の培養が最適であった．このとき誘導されたリンパ球の表面抗原を解析した結果，培養初期にはヘルパーT細胞の増加を認め，その後は次第に CTL 活性を有するサイトトキシックT細胞が誘導されると推察された．上記の至適培養条件のもとで培養継代胃癌細胞株や手術時に採取した自家新鮮消化器癌腫瘍細胞に対する CTL の誘導を rIL-2 の存在下で試みたところ，27日間の培養で誘導された CTL は凍結保存した自家腫瘍細胞に対して強い細胞傷害活性を持つようになったが，他の培養腫瘍細胞に対しては軽度の細胞傷害活性しか有しなかった．一方，消化器癌組織より分離した腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes, TIL) を rIL-2 の存在下で培養したところ，自家腫瘍細胞に対する活性が誘導できたが，同時に他の培養腫瘍細胞に対しても同程度の細胞傷害活性が認められ，TIL の自家癌特異的細胞傷害活性は確認できなかった．

Key words cytotoxic T lymphocytes, in vitro sensitization, mixed lymphocyte culture, interleukin-2, adoptive immunotherapy

近年，遺伝子工学や細胞工学の進歩に伴い各種のサイトカイン遺伝子が単離されそれらの産物が大量に産生されるようになり，悪性腫瘍に対してサイトカインを用いた免疫療法，および生体外で遺伝子組換え型インターロイキン-2 (recombinant interleukin-2, rIL-2) によって活性化されたキラー細胞 (lymphokine activated killer cells, LAK) を担癌患者に移入する養子免疫療法[1)2)]が行われるようになった．一方，これら

Abbreviations: BRM, biological response modifiers; CD, cluster of differentiation; CTL, cytotoxic T lymphocytes; E/T ratio, effector/target ratio; FCS, fetal calf serum; IL-2, interleukin-2; IVS, in vitro sensitization; LAK, lymphokine activated killer cells; MHC, major histocompatibility complex; MLC, mixed lymphocyte culture; MMC,

の非特異的免疫療法に代わり，自己腫瘍細胞を選択的に傷害する特異的細胞傷害性T細胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL) を用いた特異的免疫療法は，より有効な治療法になりうると注目を集めつつある．腫瘍感作Tリンパ球の移入がマウスの実験腫瘍系の治療に有効であり腫瘍の完全消失を認める場合もあることが数多く報告[3)~9)]されているが，ヒトCTLの臨床応用に関しての報告例は少ない。CTLを臨床応用するためには，担癌患者より入手したリンパ球を生体外の操作で特異的腫瘍傷害活性の高い細胞に誘導し増殖させることが必要不可欠であるが，CTLの誘導条件の検討はマウスでの報告に比してヒトでは未だ不十分である．

そこで本研究では生体外培養刺激系 (in vitro sensitization, IVS) で消化器系癌患者の胃癌，大腸癌細胞に対する特異的腫瘍傷害活性を有するCTLの効果的誘導が可能な培養条件に関する基礎的検討を行った．すなわちCTL誘導のモデルとして，抗原刺激細胞にLAK細胞では傷害されない非自己ヒトリンパ球を用いるリンパ球混合培養法 (mixed lymphocyte culture, MLC) を用いて至適培養条件を検討した．さらに自家腫瘍細胞に対しても同様にCTLが誘導可能と想定して求めた至適培養条件にて自家腫瘍細胞に対するCTLを誘導をした．

材料および方法

I．リンパ球，腫瘍細胞の分離と調整

1．末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocytes, PBL) の分離

健常人は早朝空腹時に，担癌患者は手術直前に50～60mlのヘパリン加採血を行い，Ficoll-Hypaque液（比重1.077）(Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway) 上に静かに重層させ，400×g 室温で30分遠心した後中間層を採取した．得られた単核球をHanks液で2回洗浄，RPMI-1640液 (Gibco, Gran Island, New York, U.S.A.) にペニシリン 100μg/ml，カナマイシン 100μg/ml，ファンギゾン 0.1μg/ml および非働化牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) を10%濃度に加えた培養液（10%FCS加RPMI-1640倍地）で1回洗浄しリンパ球分画を得た．次いで10%FCS加RPMI-1640培地中に 2×10^6/ml の細胞数に浮遊させ，6穴平底マイクロプレート (Falcon, Oxnard, California, U.S.A.) を用いて培養した．培養はいずれも37°C，7%CO_2下で行った．

2．腫瘍細胞および腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes, TIL) の分離

手術時無菌的に摘出した胃癌および大腸癌組織より腫瘍組織を採取し，健常組織，壊死組織を除去，抗生物質を含むHanks液で洗浄後，メス，眼科用ハサミで $1mm^3$ 程度の大きさになるまで細切した．次いでコラーゲン組織消化酵素コラゲネース (collagenase type I-S, 2mg/ml, Sigma, St. Louis, U.S.A) およびDNA分解酵素DNエース (DNase type I, 0.4mg/ml, Sigma) を含むHanks液中に細切した組織を浮遊させ37°Cで1時間攪拌した．得られた細胞浮遊液をナイロンメッシュに通過させ単個浮遊細胞を調整した．癌性胸水，腹水は無菌的に採取後 200×g，5分間遠心して細胞分画を得た．TILと腫瘍細胞を分離する目的で，細胞浮遊液を3回洗浄し，Ficoll-Hypaque 比重遠心法を20°Cで 400×g，30分間施行した後，中間層を採取しさらに100%と75%のFicoll-Hypaque2段階不連続密度勾配法 (20°C，400×g，30分間) で腫瘍細胞に富む分画とTILに富む分画に分離した．TILは10%FCS加RPMI-1640培地中に 2×10^6/ml の細胞数に浮遊させた．腫瘍細胞に富む分画は，さらに25%，15%，10%のPercoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 3段階不連続密度勾配遠心法 (20°C，25×g，7分間) により腫瘍細胞を純度90%以上にした．単離した腫瘍細胞を 5×10^5 cells/ml の細胞数で20%FCS加AIM-V培地 (Gibco) に浮遊させ凍結保存もしくは培養し刺激細胞および標的細胞に供した．腫瘍細胞の培養は37°C，7%CO_2下で行った．

3．脾臓リンパ球 (spleen lymphocytes, SL) の分離

術中無菌的に採取した脾臓をHanks液中で眼科用ハサミを用いて細切し，金属メッシュ (NBC工業，大阪) で細胞浮遊液を濾過した後，Ficoll-Hypaque比重遠心法によりリンパ球分画を得た．次いで10%FCS加RPMI-1640倍地中で 2×10^6/ml の細胞数に調整した．培養はいずれも37°C 7%CO_2下で行った．

なお，培養液交換は5日ごとに行い，細胞数の算定はトリパンブルー生体染色法により顕微鏡下で行った．

II．CTLの誘導法

1．非自己ヒトリンパ球に対するCTLの誘導は

---

mitomycin C; NK, natural killer cells; PBL, peripheral blood lymphocytes; PHA, phytohemagglutinin; rIL-2, recombinant interleukin-2; SL, spleen lymphocytes; S/R ratio, stimulator/responder ratio; TIL, tumor infiltrating lymphocytes

MLC で以下のように行った．まず，ある健常人より分離した PBL をマイトマイシンC (mitomycin C, MMC，協和醗酵，東京) 50μg/ml 含む10%FCS 加 RPMI-1640 倍地中に 1～2×10⁷/ml の細胞数で浮遊させ37°C30分間処理して抗原刺激細胞 (stimulator cells) とした．次に他の健常人または胃，大腸癌患者から得られた PBL を反応細胞 (responder cells) とし，抗原刺激細胞対反応細胞比 (stimulator/responder ratio, S/R ratio) 1/1の割合で 10%FCS 加 RPMI-1640 培地中に 2×10⁶/ml の細胞数となるよう混合し，37°C，7%CO_2の条件下で静置培養した．添加する rIL-2 (S-6820，塩野義製薬，大阪) の効果は，10～10000u/ml (旧単位，1u は 0.7 JRU に相当する) 濃度の rIL-2 を培養開始日に培養液を加えるか，または培養3日目，培養6日目あるいは培養9日目に10000u/ml 濃度の rIL-2 を培養液に加えることによって誘導される作働細胞 (effector cells) の細胞傷害活性にて調べた．

2．腫瘍細胞に対する CTL の誘導

健常人または胃癌，大腸癌患者から得られた PBL を反応細胞とし，手術時に得られた新鮮腫瘍細胞または培養継代胃癌細胞 GC 022588 を抗原刺激細胞として rIL-2 の存在下で混合培養を行った．抗原刺激細胞として用いた腫瘍細胞 (6～12×10⁶cells) は MMC 100μg/ml 含む 10%FCS 加 RPMI-1640 培地中で 1～2×10⁶/ml の細胞数に浮遊させ，37°C，60分間処理し Hanks 液で3回洗浄した．次いでこの抗原刺激細胞に健常人または担癌患者の PBL を反応細胞として S/R ratio 1/10で混合し，さらに rIL-2 を 1000u/ml 濃度で添加した．培養は37°C，7%CO_2下で静置培養し，生細胞数および細胞傷害活性を経時的に測定した．

なお培養継代胃癌細胞 GC 022588, GC 101488 および GC 121288 は高知医科大学，免疫学教室，藤本重義教授の御厚意により供与を受けた．

Ⅲ．細胞傷害活性の測定

ナチュラルキラー (natural killer cells, NK) 活性は K-562 (継代培養したヒト赤白血病細胞由来の細胞株) を標的細胞 (target cells) として，LAK 活性は Daudi (ヒトバーキットリンパ腫由来の細胞株) を標的細胞として，また CTL 活性は抗原刺激細胞に用いた腫瘍細胞またはリンパ球を標的細胞として4時間 ^{51}Cr 遊離試験 (4hr specific ^{51}Cr release assay) にて測定した．リンパ球を標的細胞とする場合は植物凝集素フィトヘマグルチニン (phytohemagglutinin,PHA) を添加培養し芽球化させた．

まず，刺激培養したリンパ球を 2×10⁶/ml に調整し，96穴U底マイクロプレート (Falcon) に 100μl ずつ分注し作働細胞とした．そして 5×10⁵cells/ml に調整した K-562, Daudi，腫瘍細胞および芽球化リンパ球の浮遊液に 100μl の Na_2CrO_4, 2mci/ml (New England Nuclear, Boston, Massachusetts, U.S.A.) を加え，37°C，5%CO_2下で1時間反応させた．次いで3回 Hanks 液で洗浄した後 10%FCS 加 RPMI-1640 培地に浮遊させ 1×10⁵cells/ml の細胞数に調整後，その100μl を各作働細胞に加えた．この条件で作働細胞対標的細胞比 (effector/target ratio, E/T ratio) は20/1となる．各プレートを37°C，5%CO_2下で4時間反応後，各穴の上清100μl を採取し上清中に放出された ^{51}Cr 量をオートウェルガンマーカウンターARC501 (アロカ，東京) を用いて測定し，下記の計算式にもとづいて NK 活性値，LAK 活性値および CTL 活性値を算出した．

$$\text{細胞傷害活性 (\% cytotoxic activity)} = \frac{^{51}\text{Cr 実測値} - ^{51}\text{Cr 自然放出量}}{^{51}\text{Cr 最大放出量} - ^{51}\text{Cr 自然放出量}} \times 100\ (\%)$$

^{51}Cr 最大放出量は ^{51}Cr 標識標的細胞には1～2%トリトン X100 (和光，大阪) を100μl 加え溶解させた後の上清中の ^{51}Cr 量で示した．標的細胞からの ^{51}Cr 自然放出量は，10%FCS 加 RPMI-1640 培地を100μl 加え37°C，5%CO_2下で4時間培養させた後の上清中の値である．

Ⅳ．作働細胞の細胞表面抗原の解析

ヒトリンパ球に対する各種モノクローナル抗体を用いたリンパ球亜分画の検討を行った．ヘパリン加全血 50μl にリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) で希釈した螢光色素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識モノクローナル抗体 50μl を加え混和後，氷中で30分反応させた．次いで反応液に赤血球溶解用試薬 (lysing reagent，和光) を 1ml 添加し，15分間室温で反応させた．赤血球の溶血を目視にて確認後，レーザーフローサイトメーター FCM-1 (日本分光，東京) を用いて，螢光細胞数を測定した．螢光色素標識モノクローナル抗体は，ヒト白血球表面抗原分類 (cluster of differentiation, CD) の CD3 抗原 (末梢血T細胞のマーカー) を認識するモノクローナル抗体 OKT3, CD4 抗原 (ヘルパー/インデューサーT細胞のマーカー) を認識するモノクローナル抗体 OKT4, CD8 抗原 (サプレッサー/サイトトキシックT細胞のマーカー) を認識するモノクローナル抗体 OKT8 (Ortho Diagnostic System, Raritan,

New Jersey, U.S.A.) を用いた．また CD8 抗原陽性細胞に対する二重染色解析を行うため CD11b 抗原を認識するモノクローナル抗体 Mo I (Coulter, Hialeah, Florida, U.S.A.) を用いた．

V．測定値の有意差検定

以上の実験群の値は平均値±標準偏差 (mean±S.D.) をもって示した．同一症例における 2 群間の平均値の有意差検定には，対応のある標本の t 検定を用い，また他群間の有意差検定には，等分散の F 検定を行い，必要に応じて Welch の補正を行ったあと，対応のない場合の t 検定を行い，危険率 5 %以下を有意差ありと判定した．

成　　績

I．株化腫瘍細胞に対する CTL 誘導

男性 8 名，女性 2 名の健常人の PBL を用いて培養胃癌細胞 GC 022588 に対する CTL 誘導に際して，現在報告されている方法に従い11日間の IVS を試みた．誘導されたリンパ球の GC 022588 に対する細胞傷害活性は培養11日後に23.5±17.1%であった．しかし同時に測定した K-562 に対する細胞傷害活性 (NK 活性) は60.1±22.9% Daudi に対する細胞傷害活性 (LAK 活性) は29.7±14.0%を示した．従って，この11日間の培養では腫瘍細胞傷害活性ばかりではなく，NK 活性，LAK 活性も強く誘導されていることが明

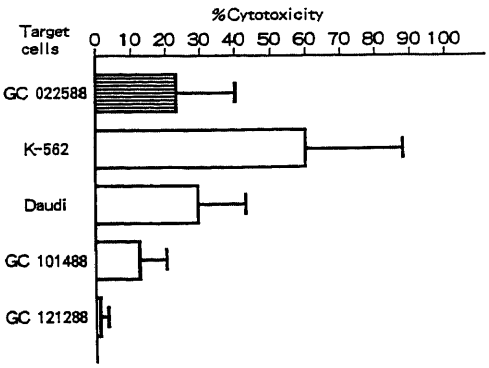


Fig. 1. The cytotoxic activity of IVS effector cells after 11 day culture. PBLs from 8 males and 2 females of healthy adults were cultured with one tenth number of GC 022588 tumor cells in the presence of 1000u/ml of rIL-2. Tumor cells were pretreated with 100 μ g/ml MMC, 37°C, 1hr. The cytotoxic activities against GC 022588, K-562, Daudi, GC 101488 and GC 121288 were tested by using specific ^{51}Cr release assay for 4hrs at E/T ratio of 20/1. Each data shows mean±S.D..

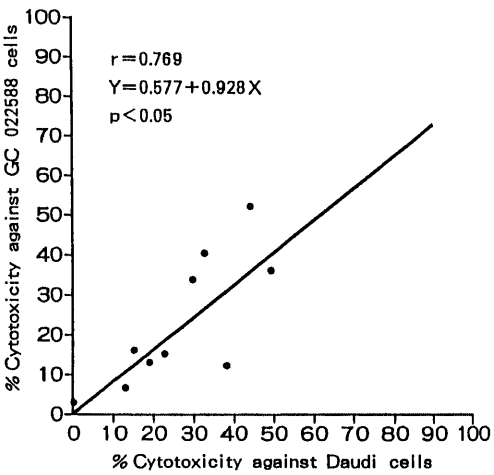


Fig. 2. The characterization of the cytotoxic lymphocytes stimulated with allogenic human gastric cancer cell line, GC 022588. The cytotoxicity against GC 022588 cells correlated singnificantly with that observed with Daudi cells (r=0.769, p<0.05).

Table 1. Correlation between cytotoxic activities of 11 day IVS effector cells from PBLs from 8 males and 2 females healthy adults against K-562, Daudi and GC 022588 cells

Target cells	Correlation coefficients	Regression line	t value	p value
K-562 and Daudi	0.419	Y=35.03+0.983X	1.137	NS
K-562 and GC022588	0.421	Y= 7.76+0.262X	1.130	NS
Daudi and GC022588	0.769	Y=0.577+0.929X	2.947	p<0.05

The cytotoxic activities were determined at 11 day culture. The cytotoxic activity of lymphocytes stimulated with GC 022588 cells correlated significantly with the cytotoxic activity of LAK (Daudi) (r=0.769, p<0.05). While the cytotoxic activity against GC 022588 cells was not related to NK (K-562) activity. And NK activity was not also related to that of LAK.

らかになった (図1). LAK 活性と GC 022588 細胞傷害活性の相関関係を調べたところ, 相関係数0.769の有意 ($p<0.05$) な正の相関を示した (図2). LAK 活性と NK 活性は相関係数0.419, NK 活性と GC 022588 細胞傷害活性は相関係数0.421でそれぞれ有意な相関関係は認めなかった (表1).

II. 非自己ヒトリンパ球に対する CTL 誘導

CTL 誘導のモデルとして MLC にて非自己ヒトリンパ球に対する CTL の誘導を行い至適培養条件を検討した.

1. rIL-2 の添加条件

まず予備実験として rIL-2 の添加条件について検討した. 健常人5名の PBL を反応細胞に用い MLC にて非自己ヒトリンパ球に対する CTL 誘導を行う際に, 培養開始日に rIL-2 を 10u/ml, 100u/ml, 1000u/ml および 10000u/ml 濃度の添加した群を作製し, 各 rIL-2 濃度の培養で誘導される作働細胞の細胞傷害活性を比較した. また培養開始日, 培養3日目, 培養6日目または培養9日目にそれぞれ 1000u/ml 濃度の rIL-2 を添加した群を作製し, 誘導される作働細胞の

Table 2. The determination of the optimal rIL-2 concentration in the induction of CTLs against allogenic blastoid lymphocytes

rIL-2 concentration	Target cells	% Cytotoxicity in culture		
		Day 0	Day 6	Day 11
10 u/ml	Allogenic lymphocyte	4.1±1.4	19.4± 8.6#	15.3± 6.1
	Daudi	1.2±0.9	21.6±12.2	9.6± 5.5
100 u/ml	Allogenic lymphocyte	4.1±1.4	23.7±11.3	31.0±18.4
	Daudi	1.2±0.9	28.2±10.8*	14.3± 7.4
1000 u/ml	Allogenic lymphocyte	4.1±1.4	24.4±11.1	44.3±13.8*#
	Daudi	1.2±0.9	53.4±11.0**	48.3± 1.4
10000 u/ml	Allogenic lymphocyte	4.1±1.4	25.2±13.4	32.8±22.5
	Daudi	1.2±0.9	56.0±10.4**	36.9±20.7

*p<0.05 **p<0.01 #p<0.05

PBLs from 2 males and 3 females of healthy adults were cultured with an equal number of allogenic human lymphocytes which were pretreated with 50 μg/ml MMC, 37℃, 1 hr. The various concentrations of rIL-2 were tested for the induction of CTLs as indicated. Each data was examined at 0, 6 and 11 days after the culture and each shows mean±S.D.. The cytotoxic activities were tested by using specific ^{51}Cr release assay for 4 hrs at E/T ratio of 20/1. * p<0.05 and ** p<0.01 compared with each cytotoxicity at day 0 by unpaired t test. # p<0.01 by unpaired t test was shown between CTL cytotoxicity at day 6 and that at day 11.

Table 3. The determination of the inoculation time of rIL-2 with the CTL induction against allogenic blastoid lymphocytes

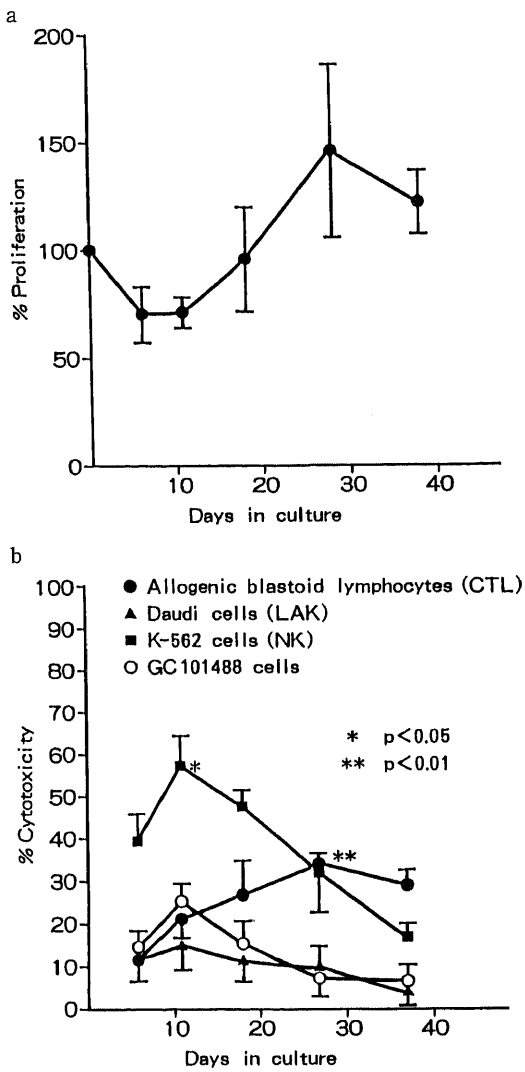
The first day when rIL-2 was added	Target cells	% Cytotoxicity in culture				
		Day 0	Day 6	Day 11	Day 18	Day 27
Day 0	Allogenic lymphocyte	4.1±1.4	24.2±11.1	38.3±13.8*	30.1±18.6	4.7±2.2
	Daudi	1.2±0.9	53.4±11.0**#	48.3±18.4	35.4±13.0	11.1±5.8
Day 3	Allogenic lymphocyte	4.1±1.4	20.6± 7.3	41.2±18.1*	33.3±12.4	14.1±8.8
	Daudi	1.2±0.9	40.7±13.1**	29.2± 8.3	26.4±11.2	20.6±7.9
Day 6	Allogenic lymphocyte	4.1±1.4	16.6± 8.8	20.7± 5.7	39.6±11.8*	35.9±9.4
	Daudi	1.2±0.9	7.0± 2.5	24.9±13.4*#	19.1± 9.0	19.6±9.2
Day 9	Allogenic lymphocyte	4.1±1.4	17.5± 7.2	25.9±15.5	11.9± 4.6	2.4±1.8
	Daudi	1.2±0.9	6.2± 2.4	13.5± 5.0	20.0± 9.4*	8.1±4.3

* p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001 # p<0.01

PBLs from 2 males and 3 females of healthy adults were cultured with allogenic human lymphocytes which were pretreated with 50 μg/ml MMC, 37℃, 1 hr. Cultures were added 1000 u/ml of rIL-2 at 0, 3, 6 or 9 days after the culture. Each data was obtained at 0, 6, 11, 18 and 27 days after the culture and each shows mean±S.D.. Cytotoxic activities against allogenic blastoid lymphocytes were tested by using specific ^{51}Cr release assay for 4 hrs at E/T ratio of 20/1. * p<0.05, ** p<0.01 and *** p<0.001 compared with each cytotoxicity at day 0 by unpaired t test. # p<0.01 by unpaired t test was shown between LAK cytotoxicity at day 6 and that at day 11.

細胞傷害活性の推移を検討した．

rIL-2 の添加濃度に関しては，細胞傷害活性は培養6日目には各群ともほぼ同様な値を示したが培養11日目では 1000u/ml で培養した群のみが有意 ($p<0.05$) な活性の増大を認めた (表2)．また，rIL-2 の添加時期に関しては，培養開始日，培養3日目，培養6日目に rIL-2 を 1000u/ml 濃度で添加した群の CTL 活性は培養後11日目または18日目に有意 ($p<0.05$) な増大を認めたが，各群間には CTL 活性の有意差は認められなかった．培養9日目に添加した群では培養期間中有意な CTL 活性誘導はみられなかった．一方，rIL-2 1000u/ml を培養開始日に添加した群に比べて培養6日目に添加した群の LAK 活性の最大値は有意 ($p<0.01$) に低下していた (表3)．



2．培養日数

男性8名，女性5名の健常人または胃癌患者20名および大腸癌患者11名 (男性21名，女性10名，平均年令50.8歳) の PBL より非自己ヒトリンパ球に対する CTL 誘導を行う際に，rIL-2 1000u/ml 濃度で培養6日目に添加培養し，生細胞数および細胞傷害活性の経時的変化を検討した．生細胞数は，培養開始日に比較

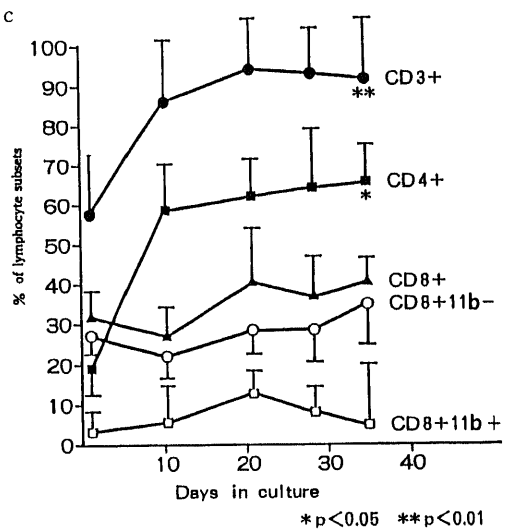


Fig. 3. The changes of immunological parameters with the effector cells against allogenic blastoid lymphocytes. PBLs from 8 males and 5 females of healthy adults, and the patients with various stages of 20 gastric cancer and 11 colonic cancer were stimulated with an equal number of allogenic human lymphocytes which were pretreated with 50μg/ml MMC, 37°C, 1hr. All cultures were carried out in the presence of 1000u/ml of rIL-2. a) Changes of % proliferation of the effector cells in the culture with rIL-2. Each data shows mean±S.D.. b) Changes with the cytotoxic activities of effector cells against allogenic blastoid lymphocytes, Daudi cells, K-562 cells and GC 101488 cells. The cytotoxic activities were examined with specific ^{51}Cr release assay for 4hrs at E/T ratio of 20/1. Each data shows mean±S. D. *$p<0.05$ compared with NK cytotoxicity at day 6 by unpaired t test. **$p<0.01$ compared with CTL cytotoxicity at day 6 by unpaired t test. c) Changes of the surface markers of the cultured cells. Each data was obtained at 6, 11, 18, 27 and 37 days after the culture and represents mean±S.D.. *$p<0.05$ compared with %CD4+cells at day 0 by unpaired t test. **$p<0.01$ compared with %CD3+cells by unpaired t test.

して培養6日目に70.0±10.1%，培養10日目71.8±5.0%と約70%に減少した．しかし，この後次第に増加し始め，培養18日目96.8±25.1%，培養27日目145.8±38.2%と培養27日目迄に細胞数の増加が認められた．以後培養37日目には121.2±13.9%で生細胞数の増加は認められなかった (図 3a)．NK 活性，LAK 活性，GC 101488 に対する各細胞傷害活性はそれぞれ培養11日目に高値を示し以後減少するのに対して，CTL 活性は培養6日目より次第に増加し，培養27日目には33.5±1.6%と有意 ($p<0.01$) な増加を認めた (図 3b)．

3．作働細胞の表面抗原の解析

誘導された作働細胞の表面抗原を解析すると，培養約10日目より CD3+ 細胞が有意 ($p<0.05$) に増加し，培養18日目には約90%の細胞が CD3+ のT細胞で占められるようになった．CD4+ 細胞は培養約10日目迄に増加を示し，培養27日目には約60%となった ($p<0.01$)．CD8+ 細胞は培養10日目頃より次第に増加し培養27日目には約40%となった．CD8+11b−細胞は培養10日目頃より経時的に増加した．CD8+11b+細胞は培養20日目に約13%であったが，以後次第に低下した (図 3c)．

4．担癌患者病期別 CTL 活性

胃癌取り扱い規約[10]および大腸癌取り扱い規約[11]に定める組織学的進行程度判定基準に従って，上記の担癌患者31名のそれぞれについて病期 (stage) を決め，各患者の病期 (病期 I 11名，病期II 6名，病期III 5名，病期IVまたはV 9名) と，PBL より培養27日目に誘導される CTL 活性との関係について検討した．

正常人と各病期群間の個体には有意差を認めなかった．しかし病期IVまたはVの患者の CTL 活性は他の群の患者の CTL 活性と比較して低値の傾向がみられた (図 4)．

5．SL より誘導した CTL 活性

男性3名，女性3名の胃癌患者 (平均年令37.7歳) から分離した SL より非自己ヒトリンパ球に対する CTL を誘導し，同一担癌患者の PBL より誘導した

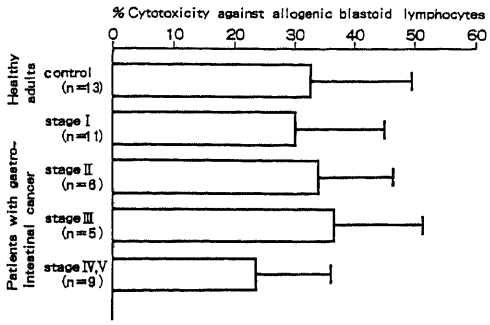


Fig. 4. The cytotoxic activities against alogenic blastoid lymphocytes with the PBLs of patients with various stages of either 20 gastric cancer or 11 colonic cancer. PBLs from 8 males and 5 females of healthy adults or the patients were cultured with an equal number of allogenic human lymphocytes which were pretreated with 50 μ g/ml MMC, 37°C, 1hr. The cultures were carried out in the presence of 1000u/ml of rIL-2. After 27 day culture, the cytotoxic activities of effector cells were examined with specific ^{51}Cr release assay for 4hrs at E/T ratio of 20/1. Each data shows mean±S.D..

Table 4. The CTL induction with spleen lymphocytes against allogenic blastoid lymphocytes after 27 days of MLC

Responder	% Cytotoxicity against allogenic blastoid lymphocytes on day 27 in culture	
Spleen lymphocytes	36.8±16.8	NS
Peripheral blood lymphocytes	30.3±16.5	

Spleen lymphocytes and PBLs from the various stages of patients including 3 males and 3 females of the gastric cancer were cultured with an equal number of allogenic human lymphocytes which were pretreated with 50 μ g/ml MMC, 37℃, 1 hr. All cultures were carried out in the presence of 1000 u/ml of rIL-2. 27 days after the culture, the cytotoxic activities were tested by using specific ^{51}Cr release assay for 4 hrs at E/T ratio of 20/1. Each data shows mean±S.D..

CTL 活性との差異を培養27日目について検討した．CTL 活性は SL，36.8±16.8%，PBL，30.3±16.5% であったが両者に有意差はみられなかった (表4)．

Ⅲ．腫瘍細胞に対する CTL 誘導

前述の至適培養条件のもとで，胃癌患者4名および大腸癌患者4名 (男性6名，女性2名，平均年令48.0歳) から分離した PBL より培養継代胃癌細胞，手術時に採取分離した新鮮腫瘍細胞に対する CTL 誘導を試みた．培養胃癌細胞および新鮮腫瘍細胞に対して培養18～27日目に最も高値をとる細胞傷害活性が誘導された．しかも新鮮腫瘍細胞に対して誘導した細胞傷害活性は培養胃癌細胞に対して誘導した細胞傷害活性よりも高値であった (図5)．

Ⅳ．TIL 活性

胃癌患者4名および大腸癌患者4名 (男性6名，女性2名，平均年令48.0歳) につき手術時に採取した標本より分離した TIL を rIL-2 (1000u/ml) 存在下で静置培養し，自己腫瘍に対する細胞傷害活性 (TIL 活性) を，NK 活性，LAK 活性および GC 101488 細胞傷害活性と比較した．TIL 活性は，培養11日目に最も高値を示し，この結果は LAK 活性の場合とほぼ一致した (図6)．

考　　察

免疫療法は悪性腫瘍患者に対する補助療法の一つであるが，過去には主に生体反応修飾物質 (biological

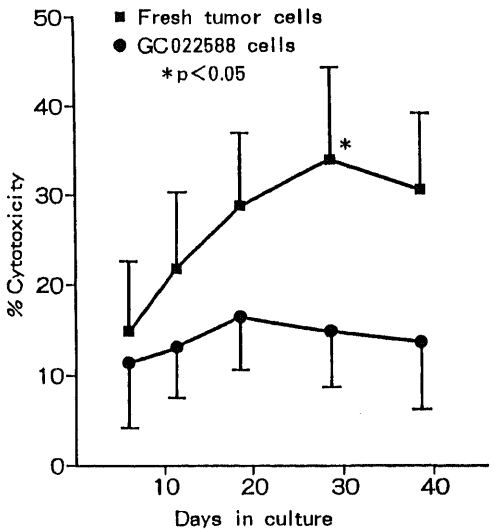


Fig. 5. The cytotoxic activity of IVS effector cells against the fresh tumor cells and GC 022588 cells. PBLs from either 4 gastric cancer or 4 colonic cancer patients were stimulated with 1/10 of autologous fresh tumor cells which were pretreated with 100 μg/ml MMC, 37°C, 1hr. The cultures were carried out in the presence of 1000u/ml of rIL-2. PBLs from 2 males and 4 females of healthy adults and the patients of various stages including 6 gastric cancer and 3 colonic cancer were stimulated with GC 022588 cells which were pretreated with 100μg/ml MMC, 37°C, 1hr. All cultures were carried out in the presence of 1000u/ml of rIL-2. The cytotoxic activities were treated by using specific ^{51}Cr release assay for 4hrs at E/T ratio of 20/1. Each data shows mean±S.D.. $p<0.05$ compared with the cytotoxicity against fresh tumor cells at day 6 by unpaired t test.

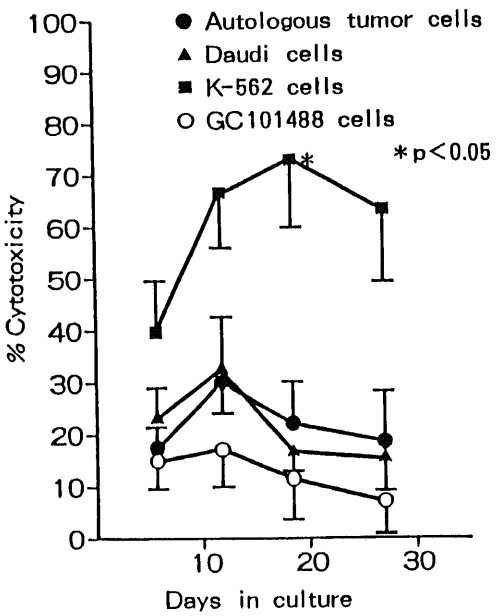


Fig. 6. RIL-2 augmentated LAK activities of TIL. TILs from various stages of the gastrointestinal cancer patients including 4 gastric cancer and 4 colonic cancer were tested in this experiment. TILs were separated and purified from the mass of the gastrointestinal cancer tissues. TILs were cultured in the presence of 1000u/ml of rIL-2. The cytotoxic activities against autologous tumor cells, K-562, Daudi and GC 101488 cells were examined with specific ^{51}Cr release assay for 4hrs at E/T ratio of 20/1. Experiments were tested at 6, 11, 18 and 27 days after the culture. Each data shows mean±S.D.. $*p<0.05$ compared with NK cytotoxicity at day 6 by unpaired t test.

response modifiers, BRM) を患者に直接投与することが主体であった．BRM による非特異的抗腫瘍効果は生体内の各種の免疫監視機構[12]に依存しており，日常臨床上，担癌患者が末期あるいは全身状態不良の場合，免疫不全状態をきたしていることが多く抗腫瘍効果が十分期待できないのが現実である．これらの患者の免疫療法として，抗腫瘍活性を持つリンパ球を生体外で大量に誘導し[13)14]担癌生体へ戻す，いわゆる養子免疫療法が注目を集めてきた．

Rosenberg ら[1)2)15]は PBL をインターロイキン 2 (interleukin-2, IL-2) で活性化した LAK を癌治療に応用し悪性黒色腫，腎癌，大腸癌などである程度の臨床効果を認めたと報告している．しかし，この LAK 療法は rIL-2 の大量投与による血管透過性の亢進による障害 (capillary permeability leak syndrome) があること，実効性のある抗腫瘍効果を得るためには大量の LAK 細胞を移入する必要があること，LAK には自己腫瘍細胞に対する特異性がないこと，腫瘍局所への集積性が悪いことなどからその治療効果には限界があると考えられた．

LAK 療法の効果をさらに高める方法として TIL 療法が報告された．Fisher ら[16]は皮膚転移を伴う悪性黒色腫の患者に ^{111}In で標識した活性化 TIL を静脈内に移入したところ，24時間以内に皮膚転移の腫瘍局所に移入 TIL が集積しはじめ，それは正常皮膚組織に比べ 3～40倍高率であったと報告した．また Rosenberg ら[17]は微小転移を有するマウスの実験で TIL を移入した際にその抗腫瘍効果は末梢血由来の LAK と比較して50倍から100倍の効果があったと報告した．このように TIL の腫瘍組織への集積性と抗腫瘍効果に正の関係が認められることから TIL は腫瘍抗原で特異的に感作されている可能性があり，この活性化 TIL 移入療法は有効な特異的免疫療法として期待された[18)~23]．

一方，抗腫瘍効果の高い腫瘍特異性を持つ感作T細胞を生体内および生体外の実験系において能動的に誘導しようとする試みがなされてきた．藤本[3]，Shu ら[5]はマウスの科学誘発腫瘍に対して特異的細胞傷害活性を有するT細胞を誘導した．また Sharma[24]は細片化腫瘍細胞とリンパ球を混合培養することによって，Shu ら[6)7]および Chou ら[8]は放射線処理した腫瘍細胞を IL-2 存在下でリンパ球と混合培養する，いわゆる IVS によって腫瘍感作T細胞を誘導し抗腫瘍性の増強およびT細胞数の増加を報告した．この腫瘍感作T細胞は腫瘍に対して特異的細胞傷害活性を有し，CTL と命名された．CTL の移入療法はマウスの実験腫瘍系の治療に効果的で，ヒト癌治療の補助療法としての応用に大きな期待が集められている[25)~27]．

CTL のヒトでの臨床応用には担癌患者のリンパ球を生体外の操作で有効な腫瘍細胞傷害活性を有する細胞に誘導し増殖させる[28)29]ことが不可欠であるが，ヒト悪性腫瘍に対する CTL 誘導の至適培養条件の検討は未だ十分になされていない．そこで本研究では IVS 法によるヒト CTL 誘導に必要な諸条件について検討した．

現在本邦では，CTL 誘導法として培養腫瘍細胞と PBL に rIL-2 を加え 1～2 週間培養する IVS 法が主に行われており，著者もまずこの方法によって誘導された活性化T細胞の性状を検討した．培養継代胃癌細胞株 GC 022588 を MMC 処理し抗原刺激細胞として健常人の PBL と混合後，rIL-2 を添加して11日間培養を行ったのちに誘導された作働細胞は，GC 022588 に対して細胞傷害活性を示したが，同時に NK 活性，LAK 活性をも示した．さらに，この GC 022588 に対する細胞傷害活性は LAK 活性と相関係数0.769の有意な正の相関関係を認めたことから，この11日間この培養で誘導された作働細胞は CTL よりはむしろ LAK であろうと推察された．

そこで，特異的細胞傷害活性を有する CTL 誘導を確認するためには LAK 活性と CTL 活性を明確に区別して検討する必要がある．すなわち，誘導される CTL 活性と LAK 活性をそれぞれ区別するために CTL で傷害されるが LAK では傷害されない細胞を抗原刺激細胞とするのが理想的である．本研究では抗原刺激細胞として非自己のヒトリンパ球を用いた．何故ならば抗原刺激細胞であるリンパ球を標的細胞とした場合，LAK は正常リンパ球を傷害しないので，観察される細胞傷害活性はほとんどが CTL 活性と考えられるからである．本研究での予備実験においても rIL-2 を添加培養して得られる LAK は PHA で芽球化したヒトリンパ球に対し細胞傷害活性を有しなかった．

もう一つの問題点として，CTL を用いた免疫療法では治療に用いるリンパ球の量より質が重要な要素となることがあげられる[26]．つまり，CTL の実際の治療効果（腫瘍マーカーの減少や腫瘍の縮小）は投与するリンパ球数に比例するのではなく，むしろ腫瘍に対し実効性のある特異的な CTL を誘導することが重要であるといえる．そこで本実験では特異的細胞傷害活性の高い CTL を効果的に誘導できる培養諸条件についても詳細に検討した．また従来報告されてきた MLC による CTL の誘導では，抗原刺激細胞と反応細胞の

割合は1対1が最適であるとされているので，本研究においてもこれに準じた．

まずrIL-2の添加時期および至適濃度に関して検討した結果，rIL-2の添加濃度は1000u/mlが最適であった．添加時期は，rIL-2を培養開始日，培養3日目，培養6日目のいずれの場合に添加しても誘導されるCTL活性には有意差が認められなかった．また培養6日目にrIL-2を添加した場合では，同時に測定されたLAK活性が極めて低値であった．従って，培養6日目にrIL-2を添加する培養方法が最適と考えられた．

上記のrIL-2の添加条件にて特異的細胞傷害活性の高いCTLを誘導するのに要する培養期間の検討を行った．同一個体の健常人のPBLを抗原刺激細胞とし，他個体の健常人，担癌患者のPBLを反応細胞としてCTL誘導を試みた結果，リンパ球の生細胞数は培養6日目には70%にまで減少したが，この後次第に増加が認められ培養27日目には150%に増加した．つまり，培養開始初期ではCTL反応細胞が抗原感作(primary sensitization)されている期間であり細胞増殖は優位ではなく，抗原感作に続いてCTLの増殖反応が生じCTL活性が増加してくると推察された．培養リンパ球のNK活性，LAK活性は培養11日目に最も高値を示し続いて経時的に減弱するのに対して，CTL活性は11日目以降から増加を示し培養27日目には有意($p<0.01$)な細胞傷害活性が認められた．以上の結果よりNK活性，LAK活性とCTL活性の誘導される時期に明らかな差異があり，効果的なCTL誘導にはNK活性，LAK活性が極めて低値を示しCTL活性が高値を示す25日～30日間の培養が最適であるといえる．

次に，ここでのMLCによって誘導された細胞の表面抗原を解析しリンパ球亜群を検討したところ，培養開始初期ではCD3+のT細胞が優位であり，特にCD4+のヘルパーT細胞が有意($p<0.05$)に増加していた．CD8+のサプレッサー/サイトトキシックT細胞は培養後経時的に増加し，特にCD8+11b−のサイトトキシックT細胞は培養10日目頃より経時的に増加した．この成績より培養開始初期にはヘルパーT細胞が増加し，以後はヘルパーT細胞の作用でCTL活性を有するサイトトキシックT細胞が誘導されてきたものと推察された．抗腫瘍免疫応答の成立に関してはヘルパーT細胞が自己主要組織適合抗原(major histocompatibility complex, MHC)と腫瘍抗原を認識し活性化[30]され，種々のサイトカインが産生され，CTL, NK，マイクロファージなどの活性化が生じ腫瘍細胞を破壊すると想定され，著者の成績にも一致するものであった．

次に，非自己リンパ球に対するCTL誘導と同様な機構で腫瘍細胞に対するCTL誘導可能と想定し，本研究で得られた至適培養条件のもとで手術時に採取分離した新鮮腫瘍細胞，培養継代腫瘍細胞株に対して実効力のあるCTLの誘導を試みた．誘導された作働細胞は27日間の培養で抗原として用いた刺激細胞に対して有効な細胞傷害活性を示したが，新鮮腫瘍細胞を刺激細胞とした場合，より有効な細胞傷害活性を持つCTLが誘導された．この培養27日目に誘導された作働細胞のNK, LAK活性は低値を示し，また他の培養胃癌細胞に対する傷害活性も低値であったので，本研究において観察された腫瘍細胞傷害活性はCTL活性そのものか，CTL活性に極めて類似したものであると考えられた．またCTL誘導にあたっては，培養継代胃癌細胞株を刺激細胞として用いた場合，表面抗原性，特にMHC抗原の継代的変化で反応細胞の腫瘍細胞認識は正常と異なると推定され，刺激細胞としては表面抗原性の変化が比較的少ない新鮮な腫瘍細胞が最適である事は当然と予想される．事実，培養胃癌細胞表面のクラスI抗原を分析した結果，今回用いたGC 022588細胞のクラスI抗原はほとんど発現されていなかった．

担癌患者の病期別のCTL誘導能の差異を検討すると，病期III～Vなどの担癌患者のPBLからも細胞傷害活性には個々の違いは認められるがCTL誘導が可能であった．またSLを材料として誘導されたCTL活性を同個体のPBLの場合と比較した結果，いずれの場合にも有効なCTLは誘導可能であり，両者の活性には有意差が認められなかった．従って手術時に脾臓を摘出できれば脾臓より大量のリンパ球が分離可能であり，PBLを材料とした場合と同等の活性が期待できるので術後の養子免疫療法を行う際に有力なリンパ球供給源となりうることを示唆した．

TILの自家腫瘍に対する活性もrIL-2添加培養によって誘導できたが，この活性化TILは同時にNK, LAK活性をも有した．また自家腫瘍に対する活性はLAK活性とほぼ同値であった結果から，誘導された作働細胞はTIL-LAKと推察された．従って本研究においてはTILをrIL-2で単独刺激し特異的細胞傷害活性を持つCTLを誘導することはできなかった．

今回CTLの臨床への応用を目的とし実効力の認められるCTL誘導の培養条件につき主に作働細胞の細胞傷害活性の面から検討したが，今後まだ多くの未解決の問題点が残されている．作働細胞のリンパ球を亜

群の詳細な分析，抗原特異性の問題，種々のサイトカインとの関係，作働細胞の大量培養法の確立，また刺激細胞である自己腫瘍細胞の十分な量の入手，CTL反復投与に不可欠な腫瘍細胞の長期間の維持の方法などが解決されねばならない。しかし本研究に示した如く，自家癌に対し有効な細胞傷害活性を有するCTLの誘導が可能と考えられ，CTL療法の臨床応用は癌に対する有望な治療法の一つとして大きく期待される．

結　　論

胃癌，大腸癌患者に対する術後補助療法としてCTLの臨床応用を目的に，担癌患者の末梢血リンパ球をはじめとする各種リンパ球からIVSによりCTLを誘導する培養実験を行い，以下の結論を得た．

1．健常人末梢血リンパ球から11日間のIVSで得られた作働細胞は抗原刺激細胞とした培養腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を示したが，同時にK-562, Daudiに対しても細胞傷害活性を示した．従って11日間の培養で誘導された作働細胞はCTLというよりはむしろLAKである可能性が示唆された．

2．NK, LAK活性とCTL活性を区別するため，LAKでは傷害されない非自己ヒトリンパ球を抗原刺激細胞に用い，健常人または担癌患者の末梢血リンパ球を反応細胞としてCTLを誘導する際の培養条件につき検討した．その結果，rIL-2を1000u/mlの濃度で培養6日目に添加し25日～30日間の培養を行う方法が最も効果的であった．

3．前述の至適培養条件のもとで健常人，担癌患者の末梢血リンパ球から腫瘍細胞に対するCTL誘導を試みたところ，27日間の培養で誘導された作働細胞は抗原刺激細胞とした自家腫瘍細胞に対して有意な傷害活性を示すが，NK, LAK活性は低値をとるCTLに極めて類似のT細胞が誘導された．

4．非自己ヒトンパ球に対して誘導された作働細胞の表面抗原の解析により，CTL活性を有するのはCD8+のサイトトキシックT細胞であることが推察された．

5．病期III～Vの担癌患者の末梢血からも細胞傷害活性に差はあるものの，CTLを誘導することは可能であった．

6．脾臓リンパ球からも有効なCTLが誘導可能であり，有効なリンパ球源となりうることが示唆された．

7．TILにrIL-2を添加培養することで自家腫瘍に対するLAK活性も誘導できたが，自家腫瘍特異的細胞傷害活性は確認できなかった．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜りました恩師磨伊正義教授に心から謝意を表します．また多大なる御教示と御鞭撻を賜りました高知医科大学免疫学教室藤本重義教授，本学がん研究所分子免疫部右田俊介教授，免疫生物部坂井俊之助助教授に深謝致します．さらに本研究の遂行に際し，終始御協力と御援助を戴いた本学がん研究所外科の諸先生方および田中敦子，高松美樹女史に厚く御礼申し上げます．

なお，本論文の要旨は第8回ヒト細胞研究会（東京，1990），第3回JBRM学会（横浜，1990）において発表した．

文　　献

1） **Rosenberg, S. A. & Mule, J. J.:** Immunotherapy of cancer with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2. Surgery, **98,** 437-444 (1985).

2） **Rosenberg, S. A. Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitmann, S., Chang, A. E. Vetto, J. T., Steipp, C. A. & Simpson, C.:** A new approach to the therapy of cancer based on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2. Surgery, **100,** 262-272 (1986).

3） **藤本重義：**癌免疫と癌免疫療法の展望．西日泌尿，**2,** 349-358 (1987).

4） **Rosenberg, S. A. & Terry, W. D.:** Passive immunotherapy of cancer in animals and man. Adv. Cancer Res., **25,** 323-388 (1977).

5） **Shu, S. & Rosenberg, S. A.:** Adoptive immunotherapy of newlyinduced murine sarcomas. Cancer Res., **45,** 1657-1662 (1985).

6） **Shu, S., Chou, T. & Rosnberg, S. A.:** In vitro sensitization and expansion with viable tumor cells and interleukin 2 in the generation of specific therapeutic effector cells. J. Immunol., **136,** 3891-3898 (1986).

7） **Shu, S., Chou, T. & Rosenberg, S. A.:** Generation from tumorbearing mice of lymphocytes with in vivo efficiency. J. Immonol., **139,** 295-304 (1987).

8） **Chou, T., Chang, A. E. & Shu, S.:** Generation of therapeutic T lymphocytes from tumor-bearing mice by in vitro sentitization.: culture requirement and characterization of immunologic specificity. Immunol., **140,** 2453-2461 (1988).

9） **張　高明，Suyu Shu，永井明彦，林　直樹，荒川**

正昭：担癌宿主からの抗腫瘍キラーT細胞の誘導－In Vitro Sensitization (IVS) の開発－. Medical Immunol., **16**, 155-163 (1988).

10) **胃癌研究会**：外科・病理胃癌取り扱い規約，改訂第11版，12頁，金原出版，東京，1985.

11) **大腸癌研究会**：臨床・病理大腸癌取り扱い規約，改訂第4版，32頁，金原出版，東京，1985.

12) **Uchida, A. & Hoshino, T.**: Clinical studies in cell mediated immunity in patients with malignant disease. Cancer, **45**, 476-483 (1980).

13) **Muul, L. M., Director, E. P., Hyatt, C. L. & Rosenberg, S. A.**: Large scale production of human lymphokine activated killer cells for use in adoptive immunotherapy. J. Immunol. Methods, **88**, 265-275 (1986).

14) **Hoyer, M., Meineke, T., Lewis, W., Zwilling, B. & Rinehalt, J.**: Characterization and modulation of human lymphokine (interleukin-2) activated killer cell induction. Cancer Res., **46**, 2834-2838 (1986).

15) **Rosenberg, S. A., Lotze,M. T., Muul, L. M., Chang, A. E., Avis, F. P., Leitmann, S., Linehan, W. M., Robertson, C. N., Lee, R. E., Rubin, J. T., Steipp, C. A., Simpson, C. G. & White, D. E.**: A progress report on the treatment on 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high dose interleukin-2 alone. N. Engl. J. Med., **316**, 889-897 (1987).

16) **Fisher, B., Packard, B. S., Read, E. J., Carrasquillo, J. A., Cater, C. S., Topalian, S. L., Yang, J. C., Yolles, P., Larson, S. M. & Rosenberg, S. A.**: Tumor localization of adoptively transfered Indium-111 labeled tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma. J. Clin. Oncol., **7**, 250-261 (1987).

17) **Rosenbers, S. A., Spiess. P. & Lafreniere, R.**: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor infiltrating lymphocytes. Science, **233**, 1318-1321 (1986).

18) **Itoh, K., Tilden, A. B. & Balch, C. M.**: Interleukin-2 activation of cytotoxic T lymphocytes infiltrating into human metastatic melanoma. Cancer Res., **46**, 3011-3017 (1986).

19) **Kradin, R. L., Boyle, L. A., Preffer, F. L., callahan, R. J., Barlai-Kovach, M., Strauss, H. M., Dubintt, S. & Kurnic, J. T.**: Tumor-dirived interleukin-2 dependent lymphocytes in adoptive immunotherapy of lung cancer. Cancer Immunol. Immmunother., **24**, 76-85 (1987).

20) **Topalian, S. L., Solomon, D. Avis, F. P., Chang, A. E., Freerksen, D. L., Linehan, W. M., Lotze, M. T., RoBertson,C. N., Claudia, A. S., Simon, P., Simpson, C. G. & Rosenberg, S. A.**: Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2. A pilot study. J. Clin. Oncol., **6**, 839-853 (1988).

21) **Rosenberg, S. A., Packard, B. S., Aebersold. P. M., Solomon, D., Topalian, S. L., Toy, S. T., Simon, P., Lotze, M. T., Yang, J. S., Steipp, C. A., Simpson, C., Carter, C., Bock, S., Schwartzentruber, D., Wei, J. P. & White, D. E.**: Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. N. Engl. J. Med., **319**, 1676-1680 (1988).

22) **Kradian, R. L., Kurnick, J. T., Lazarus, D. S., Preffer, F. L., Dubinett, S. M., Pinto, C. E., Gifford, J., Davidson, E., Grove, B., Callahan, R. J. & Straus. H. W.**: Tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in treatment of advanced cancer. Lancet, **1**, 577-580 (1989).

23) **山上裕機，谷村　弘，角田卓也，岩橋　誠，谷眞至，井上正也，玉井美紀子**：腫瘍浸潤リンパ球から誘導した細胞傷害性T細胞による養子免疫療法の臨床応用．日癌治会誌，**25**, 978-989 (1990).

24) **Sharma, B.**: In vitro immunization against human tumor cells with tumor cell fractions. Cancer Res., **37**, 4660-4668 (1977).

25) **藤本重義，橘川桂三，浜里真二，前田長正，荒木清典，高田　優**：CTL 療法．日臨，**46**, 400-409 (1988).

26) **橘川桂三**：CTL 療法の基礎と臨床．Biotherapy, **3**, 629-637 (1989).

27) **藤本重重，荒木清典，浜里真二，前田長正，宮澤仁志，大朏祐治，園部　宏**：がんに対する CTL を用いた腫瘍特異的免疫療法－免疫治療工学の立場から－．Biotherapy, **4**, 1614-1626 (1990).

28) **加藤恭三，吉田　純，永田正明**：IL-2 および Glioma 関連抗原を用いた In vitro Sensitization による Killer T Cell の誘導．Biotherapy, **3**, 521-526

(1989).
29) 津田浩史，梅咲直彦，川端政寛，金岡 靖，須川佶：IVS (In vitro, Sensitization) による CTL (Cytotoxic T (lymphocytes) 誘導条件の検討．Biotherapy, **4**, 1530-1537 (1990).
30) **Unanue, E. R.**: Macrophages, antigen-presenting cells, and the phenomena of antigen handling and presentation. *In* W. E. Paul, (ed.), Fundamental Immunology, 2nd ed., p95-115, Raven Press Ltd., New York, 1989.

The Induction of the Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) against Human Autologous Gastrointestinal Cancer Cells by the In Vitro Sensitization (IVS) System

Kazuhiko Omote, Department of Surgery, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920－J. Juzen Med. Soc., **100**, 243－255 (1991)

Key Words cytotoxic T lymphocytes, in vitro sensitization, mixed lymphocyte culture, interleukin-2, adoptive immunotherapy

Abstract

It has been reported that lymphokine activated killer (LAK) cells have several non-specific cytotoxic activities against various tumor cells including autologous tumor cells and several established tumor cell lines. However, the induction of cytotoxic T lymphocytes (CTLs), which are thought to have a higher degree of cytotoxic activity against autologous tumor cells than reported with LAK cells, is still required for adoptive immunotherapy in human gastrointestinal cancer patients. In this study, an attempt was made to induce human CTLs against autologous cancer cells by using in vitro sensitization (IVS). To ascertain the optimum culture conditions, such as the concentration of rIL-2 and the culture time, the mixed lymphocyte culture (MLC) was carried out at first. High cytotoxic activity against allogenic lymphoblastoid cells was observed with cultured cells in the presence of 1000 u/ml of rIL-2. The addition of rIL-2 into the culture medium was the most effective 6 days after culture. NK and LAK activity of the cultured cells was highest at 10 days and thereafter decreased to undetectable levels at 14 days, while CTLs activity gradually increased from 7 days and the highest activity was shown at 25-30 days. Significantly CD4+ cells, the helper T cells, were observed between day 5 and day 10 of culture. Then CD8+ cells, CTLs, gradually increased to 40% of the cultured cells on day 37 of culture. These results suggest that CTLs have originated differentially from the precursor cell populations of either NK cells or LAK cells. The CTLs against the autologous tumor cells were also generated by the same methods as those observed with MLC. Thus, CTLs were effectively generated by the culture of peripheral blood lymphocytes (PBLs) or spleen cells from the patients with the gastrointestinal cancer and lysed autologous tumor cells with high cytotoxic activity, but these CTLs did not lyse the allogenic tumor cells of several established cultured lines. Several investigators have reported that tumor infiltrating lymphocytes (TILs) were sensitized by autologous tumor cells in vivo and were differentiated in vitro by the stimulation of rIL-2 to CTLs which specifically lysed autologous tumor cells. In the present work, an attempt was also made to generate CTLs from TILs purified from the mass of the gastrointestinal cancer tissues. In the present experiment, rIL-2 could induce high cytotoxic activity against the autologous tumor cells but these activated TILs, also lysed K-562 and Daudi cells. These results indicated that TILs cultured with rIL-2 had a broad cytotoxic activity against various tumor cells, indicating that the stimulated TILs were LAK cells rather than CTLs.