

**SPECIFIC STUDIES OF IN VITRO GENERATED CYTOTOXIC T
LYMPHOCYTES DIRECTED AGAINST HUMAN TARGET CELLS
GROWN IN MONOLAYER CULTURE**

ヒト単層培養細胞由来標的細胞に対する試験管内
誘導細胞傷害性Tリンパ球の特異性

MITOSHI AKIYAMA, M.D. 秋山實利

KYOKO KOBUE, M.D. 小武家暁子

SAEKO FUJIWARA, M.D. 藤原佐枝子



RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION

財団法人 放射線影響研究所

A Cooperative Japan - United States Research Organization

日米共同研究機関

A paper based on this report was published in the following journal:

本報告に基づく論文は下記の雑誌に掲載された。

Hiroshima J Med Sci 32:49-58, 1983

RERF TECHNICAL REPORT SERIES

放射線影響研究所業績報告書集

The RERF Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, and advisory groups. The Technical Report Series is not intended to supplant regular journal publication.

放射線影響研究所業績報告書は、日米専門職員、顧問、諮問機関の要求に応えるための日英両語による公式報告記録である。業績報告書は通例の誌上発表論文に代わるものではない。

The Radiation Effects Research Foundation (formerly ABCC) was established in April 1975 as a private nonprofit Japanese Foundation, supported equally by the Government of Japan through the Ministry of Health and Welfare, and the Government of the United States through the National Academy of Sciences under contract with the Department of Energy.

放射線影響研究所(元ABCC)は、昭和50年4月1日に公益法人として発足したもので、その経費は日米両政府の平等分担により、日本は厚生省の補助金、米国はエネルギー省との契約に基づく米国学士院の補助金とをもって運営されている。



RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION
財団法人放射線影響研究所

SPECIFIC STUDIES OF IN VITRO GENERATED CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES DIRECTED AGAINST HUMAN TARGET CELLS GROWN IN MONOLAYER CULTURE

ヒト単層培養細胞由来標的細胞に対する試験管内
誘導細胞傷害性Tリンパ球の特異性

MITOSHI AKIYAMA, M.D. (秋山實利)¹; KYOKO KOBUKE, M.D. (小武家暁子)¹;
SAEKO FUJIWARA, M.D. (藤原佐枝子)²

Departments of Pathology¹ and Medicine²

病理部¹及び臨床部²

SUMMARY

Specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) against HLA antigens of skin fibroblasts were generated with mixed lymphocyte culture (MLC). As most human solid tumor cells grow in vitro as monolayer cells like fibroblasts, this study will be a valuable model for generating specific CTL against human cancer cells.

Nonspecific cytotoxicity (CTX) was detected as early as the 4th day by primary in vitro sensitization (IVS), and the activity continued until around the 8th day. By secondary IVS the activity was detected from the 1st day. The specific CTX by primary IVS was detectable from the 7th day to around the 10th to 12th day, and by secondary IVS, from around the 2nd to 4th day. However, obtainment of specific CTX only was rarely the case, and the probability of obtaining them did not increase until the 9th to 10th day by primary IVS and until the 3rd to 4th day by secondary IVS. This is related to reduction of blastogenic response in MLC and suggests that inactivation of blast cells generated by MLC is of importance in obtaining specific CTX.

A CTX assay was conducted using cryopreserved CTL, which revealed that in most cases nonspecific CTX either decreases or disappears altogether. On the other hand, specific CTX activity (more than 30% reduction of only test target cells) remained and the specific CTX pattern was good and evident in many cases.

要約

皮膚線維芽細胞のHLA抗原に対する特異的細胞傷害性Tリンパ球を混合リンパ球培養を用いて誘導した。大抵のヒト固型腫瘍は試験管内では線維芽細胞と同様に単層細胞として増殖するため、本調査は、ヒト癌細胞に対する特異的細胞傷害性Tリンパ球を誘導する際の貴重なモデルとなり得るであろう。

非特異的細胞傷害は試験管内一次感作では既に4日目から生じ、8日目ころまでその活性は続いた。試験管内二次感作では活性は1日目から生じていた。特異的細胞傷害は試験管内一次感作では7日目から10～12日目ごろまで検出でき、二次感作では2日目ごろから4日目まで検出できたが、特異的細胞傷害だけを得ることはなかなかまれであり、一次感作で9～10日目、二次で3～4日目にならないと検出の確率は高くならなかった。これは混合リンパ球培養における芽球化反応の減弱と関係するものであり、混合リンパ球培養で生じた芽球細胞の非活性化が特異的細胞傷害を得るのに重要であることを示唆している。

凍結保存細胞傷害性Tリンパ球を利用して細胞傷害試験を行ったところ、非特異的細胞傷害が大抵の場合、減少ないし消失することがわかった。一方、特異的細胞傷害活性(テスト標的細胞のみ30%以上の減少)は残っており、特異的細胞障害のパターンが多くの場合で明瞭に認められた。

Next, a study was made to develop a model for the generation *in vitro* of specific CTL against autologous tumor cells. Substituting HLA antigens on skin fibroblasts for cancer cell antigens, IVS was made using third party MLC. As CTL cannot be induced directly against autologous or allogeneic fibroblasts antigens themselves (same as against many autologous cancer cells in the absence of other stimulants), it was generated against fibroblast antigens by adding allogeneic lymphocytes as third party stimulators. This cryopreservation technique was also effective in increasing the specificity of CTX.

INTRODUCTION

MLC and cell-mediated cytotoxicity (CMC) studies have shown that lymphocytes cultured with allogeneic lymphocytes respond to allogeneic HLA antigens (HLA-D) by undergoing blast transformation, and subsequently CTL can be differentiated and directed against the target cell antigens present on the stimulating cells.¹⁻⁵ Whereas target cells autologous to or syngeneic with responding lymphocytes are not usually destroyed in CMC assay, in which the target cells used were grown in suspension culture.⁶⁻¹²

In practice, however, most human solid tumors are grown as monolayer culture cells *in vitro*, and when the CMC tests are performed by using effector cells generated *in vitro* against monolayer tissue culture target cells, nonspecific CTX often develops. These monolayer culture target cells appear to be very sensitive to nonspecific cytotoxic effects of blast cells.¹³⁻¹⁷

These observations led us to attempt elimination or reduction of nonspecific CTL from MLC cells when we studied cell-mediated immunity against tumors *in vitro* in order to determine whether there is any underlying specific CTX.

Thus, production of such CTL and development of methods to maintain and preserve such cells will present a useful experimental model *in vitro* to study specific cell-mediated immunity which may reflect *in vivo* phenomena arising in response to allografts or tumors.

Therefore, the present study was undertaken to establish selectively specific CTL generation by MLC against surface antigens expressed by human skin fibroblast target cells, and also to study

次に、自己腫瘍細胞に対する特異的細胞障害性Tリンパ球を試験管内で誘導するモデルを開発するための検討を行った。癌細胞抗原の代わりに皮膚線維芽細胞上のHLA抗原を代用して第三者のリンパ球を加えた混合リンパ球培養で試験管内感作を行った。自己線維芽細胞抗原又はアロ線維芽細胞抗原自身には(その他の刺激細胞を含まない多くの自己癌細胞と同様に)細胞傷害性Tリンパ球を直接誘導することはできないが、同種のリンパ球を第三者の刺激細胞として加えることにより、この線維芽細胞抗原に対する細胞障害性Tリンパ球が誘導された。細胞傷害の特異性を高めるためにもこの凍結保存技法が有効であった。

緒言

混合リンパ球培養及び細胞性細胞傷害に関する研究によって、同種リンパ球と混合培養されたリンパ球が、芽球化転換を経てアロHLA抗原(HLA-D)に反応した後、特異的細胞傷害性Tリンパ球に分化し、それを刺激細胞上の標的細胞抗原に対し誘導し得ることが明らかになった。¹⁻⁵しかし、一方では標的細胞が浮遊培養で増殖している場合は、反応するリンパ球に対して自己由来又は同系の標的細胞は細胞性細胞傷害試験で通常破壊されない。⁶⁻¹²

しかし、実際には、大部分のヒト固型腫瘍は試験管内では単層培養細胞として増殖し、単層組織培養標的細胞に対して試験管内で誘導されたエフェクター細胞を用いて細胞性細胞傷害テストを行うと、非特異的細胞傷害がしばしば発生する。これら単層培養標的細胞は、芽球細胞の非特異的細胞傷害作用に対し感受性が非常に高いようである。¹³⁻¹⁷

これらの観察の結果、潜在的な特異的細胞傷害の有無を調べるために、試験管内で腫瘍に対する細胞性免疫を研究する際、我々は混合リンパ球培養細胞から非特異的細胞傷害性Tリンパ球を排除又は削減しようと試みた。

細胞傷害性Tリンパ球の作製やそのような細胞を維持・保存する方法の開発によって、同種移植又は腫瘍に対応して起こる生体現象を反映する特異的細胞性免疫を研究するための有益な実験モデルが得られる。

故に、本研究の目的は、ヒト皮膚線維芽細胞を標的細胞にした場合、その表面抗原に対する特異的細胞

methods of cryopreservation of effector cells in order to check whether their function can be maintained. Cryopreservation has proven to be an effective way for reducing nonspecific killing cells and retaining function of specific CTX of effector cells.

For the purpose of generating specific CTL to autologous tumor cells, the conditions necessary to generate CTL against monolayer cultured tumor target cells were also studied by using allogeneic fibroblasts as stimulator cells, since they are known to bear serologically defined (SD) HLA surface alloantigens just as tumor cells bear SD antigens.

傷害性Tリンパ球の誘導を混合リンパ球培養により選択的に確立すること、並びにエフェクター細胞の機能が維持され得るかどうかを調べるため、同細胞の凍結保存法を検討することにある。凍結保存は、非特異的キラー細胞を減弱させ、エフェクター細胞の特異的細胞傷害機能を保持するのに有効な方法であると言われている。

自己腫瘍細胞に対する特異的細胞傷害性Tリンパ球を誘導するため、単層培養腫瘍標的細胞に対して細胞傷害性Tリンパ球を誘導するのに必要な条件を、同種線維芽細胞を刺激細胞として用いて検討した。というのは、腫瘍細胞が血清学的に規定された(SD)抗原を有するのと同様、同種線維芽細胞も血清学的に規定されたHLA表面抗原をもつことが知られているからである。

TABLE 1 HLA LOCUS ANTIGENS ON LYMPHOCYTES AND SKIN FIBROBLASTS OF DONORS

表1 提供者のリンパ球及び皮膚線維芽細胞上のHLA遺伝子座抗原

Normal Donors	Sex	HLA Locus Antigens			
		A	B	Cw	Dw
M.B.	M	2	7, 12	5	3
C.S.	M	2, 29	12		2
Y.K.	M	2, 9	5	1	
J.E.	F	2, 10	12, 27	1	
T.P.	F	11, W24	12, 40		
J.M.	M	1, W24	8, 15		2, 3
M.C.	F	2, 29	12		1

Dr. John Hanson (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle) & Dr. Bo Duppon (Sloan-Kettering Cancer Center, New York) tested HLA typing of donors.

Dr. John Hanson (Seattle 市 Fred Hutchinson 癌研究センター) と Dr. Bo Duppon (New York 市 Sloan-Kettering 癌センター) が、提供者の HLA 型決定をした。

MATERIALS AND METHODS

Details of the study subjects from whom lymphocytes and skin fibroblasts were obtained are shown in Table 1. HLA typing was performed by Dr. John Hanson (Fred Hutchinson Cancer Center, Seattle, Washington) and Dr. Bo Duppon (Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, New York).

Isolation of human lymphocytes from peripheral blood was performed as described elsewhere.¹⁸ Briefly, human peripheral blood mononuclear

材料及び方法

リンパ球及び皮膚線維芽細胞を収集する研究対象者については表1に詳述した。HLA型決定はDr. John Hanson (Washington州Seattle市Fred Hutchinson癌センター)及びDr. Bo Duppon (New York市Sloan-Kettering癌センター)によって行われた。

末梢血液からのヒトリンパ球の分離については別途に述べた。¹⁸要約すれば、ヒト末梢血単核細胞を

cells were isolated from normal volunteers, who were also donors of skin fibroblast cell lines, by defibrination and use of Ficoll-Hypaque solution (specific density 1.077 ± 0.001) followed by three washes before suspension in test medium for IVS. The test medium consisted of Eagle's minimal essential medium (MEM) containing 10% heat-inactivated fresh normal human serum which is usually obtained from stimulator donors in IVS, and 100 IU of penicillin and 100 μ g streptomycin/ml (1% P/S), 1% nonessential amino acid (NEAA) and 2 mM fresh L-glutamine (1% L-glutamine). These mononuclear cells were used as responder and stimulator cells for IVS.

In Vitro Sensitization. One-way MLC was used to sensitize responder normal lymphocytes under various conditions against alloantigens on irradiated stimulating lymphocytes or fibroblasts (irradiated with ^{60}Co to 2,250 rad and 4,500 rad, respectively). MLC was performed in tissue culture flasks at several ratios of responder and stimulator cells and keeping the conditions similar to those used for MLC in microtest plate (Falcon #3040), i.e., keeping constant the ratio of responder cells per bottom surface area of culture flask and the final concentration of responder cells. Unless otherwise noted, half volume of culture medium in the flasks was usually replaced every three days with fresh test medium.

Harvesting MLC Cells from Flasks and Checking Mixed Leukocyte Response by ^3H -thymidine Uptake. Eighteen hours before terminating sensitization, 0.2 ml of cell suspension was transferred from each culture flask into wells of the microtest plate. Triplicate samples were made and labelled with ^3H -thymidine (^3H -TdR, 0.5 μCi /well, specific activity 5 Ci/mmol) for 18 hours, and the cells were harvested by the cell harvester. The remaining MLC cells in the flasks were washed with Eagle's balanced salt solution (EBSS) three times and resuspended in test medium (consisting of MEM+10% prescreened heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 1% P/S, 1% NEAA, and 1% L-glutamine) for CMC assay. The cells were counted with trypan blue solution and adjusted to 2.5×10^6 /ml.

Freezing and Thawing MLC Cells. The cryopreservation method used was a slight modification of Miller et al.¹⁹ The cells were centrifuged and resuspended in the test medium for CMC, to

健常者(皮膚線維芽細胞株の提供者でもある)から脱フィブリン法と Ficoll-Hypaque 液(比密度 1.077 ± 0.001)を用いて分離し、3回洗浄後、試験管内感作のためテスト培養液に浮遊した。このテスト培養液の構成は、試験管内感作における刺激細胞提供者から通常得られる新鮮正常ヒト血清を熱不活性化したものを10%含むEagle's最小必須培養液(MEM)、ペニシリン100IU/ml、ストレプトマイシン100 μg /ml(1% P/S)、1%非必須アミノ酸、及び新鮮L-グルタミン2mM(1% L-グルタミン)からなる。これらの単核細胞は、試験管内感作のための反応細胞及び刺激細胞として用いた。

試験管内感作. One-way 混合リンパ球培養を用いて、種々の条件下で、放射線を照射した刺激リンパ球又は線維芽細胞(それぞれ2,250rad, 4,500radの ^{60}Co を照射した)上のアロ抗原に対して反応する正常リンパ球を感作した。組織培養フラスコ内で、反応細胞及び刺激細胞を幾つかの比率に分けて混合リンパ球培養を行った。この際、培養条件は、マイクロテストプレート(Falcon #3040)で行った混合リンパ球培養の条件と同様なものとした。すなわち、反応細胞/培養フラスコの培養面積の比率及び反応細胞の最終濃度を一定とした。特に断わらないかぎり、フラスコ内の培養液の半分を、3日ごとに、新鮮なテスト培養液と交換した。

フラスコからの混合リンパ球培養細胞の収集及び ^3H -チミジン取り込みによる混合白血球反応試験。感作終了の18時間前に、0.2mlの細胞浮遊液を各培養フラスコからマイクロテストプレートの穴へ移した。各標本を三つ作成し、 ^3H -チミジン(^3H -TdR, 0.5 μCi /穴、比活性5 Ci/mmol)で18時間標識した。細胞は細胞採取器で採取した。フラスコに残った混合リンパ球培養細胞をEagle's緩衝食塩水で3回洗浄し、テスト培養液(MEM+スクリーニング済みの熱不活性化10%仔牛血清、1% P/S、1%非必須アミノ酸及び1% L-グルタミン)で再浮遊し、細胞性細胞傷害試験を行った。細胞はトリパン・ブルー液で数え、 2.5×10^6 /mlに調整した。

混合リンパ球培養細胞の凍結と解凍. 使用した凍結保存法は、Millerら¹⁹の方法を若干変えたものである。細胞を遠心分離し、細胞性細胞傷害用のテスト

which, then, were added an equal amount of cold-freezing MEM containing 50% heat-inactivated FCS and 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) to secure a final concentration of 30% FCS, 10% DMSO, and $10\sim 20 \times 10^6$ cells/ml. One ml of this cell suspension was transferred to a nunc vial (NUNC serum tubes #1076-01, Vanguard International), and the vials were kept in ice water for 5-10 minutes and placed in a -80°C freezer (Revco) overnight prior to transferring into liquid nitrogen. The rate of freezing in this system is four times as fast as that in a rate-controlled freezer.

For recovery of frozen cells, the vials were thawed in 37°C water bath with gentle agitation until the last ice crystals disappeared. Thawed vials were kept in ice water and within five minutes the contents were slowly diluted with an equal volume of cold medium containing 15% FCS and thoroughly mixed. This was repeated two more times to secure a final dilution of 1:8-1:12. This suspension was washed twice by centrifuging, and the pellets were resuspended in test medium for determination of viability, recovery, and cytotoxic activity. The percent viability of frozen-thawed cells was $86.5 \pm 8.1\%$ in unsensitized cells and $84.6 \pm 6.7\%$ in sensitized cells, and the percent recovery was $53.6 \pm 14.7\%$ in unsensitized cells and $62.4 \pm 14.1\%$ in sensitized cells.

Cell Culture. Culture of normal skin fibroblasts was initiated with finely minced explants from seven healthy donors. The culture was maintained in a complete medium consisting of 1% NEAA, 2 mM fresh L-glutamine, 1% P/S, and 15% pre-screened FCS in MEM. Cultures exhibiting contamination were discarded. These fibroblasts were used as monolayer culture target cells in microcytotoxicity assay and as a source of HLA-SD antigens in IVS between the 2nd to 17th passages in vitro.

^3H -proline Cell-mediated Cytotoxicity Microassay. Cultured skin fibroblasts were labeled overnight with $50 \mu\text{Ci/ml}$ of ^3H -proline (specific activity $21.9\sim 24.6 \text{ Ci/mmol}$), trypsinized, resuspended in test medium, and distributed into microtest plates at 1,000 viable labeled target cells per well, as described elsewhere.^{17,20-24} Unless otherwise noted, a ratio of 250 effector cells to one target cell was used for ^3H -proline CMC assay. After 40 hours of incubation in 5% CO_2 and humidified air at 37°C , unattached dead

培養液で再浮遊し、これに、50%熱不活性化仔牛血清及び20%ジメチル・スルフォキシド (DMSO) を含む冷却 MEM を等量ずつ加え、最終濃度を仔牛血清30%、ジメチル・スルフォキシド10%中に、 $10\sim 20 \times 10^6$ 個/ml になるようにした。この細胞浮遊液 1 ml を nunc バイアル (NUNC 血清試験管 #1076-01, Vanguard International) に移し、バイアルを氷水中に 5~10分間浸し、 -80°C のフリーザー (Revco) に一晚置き、その後液体窒素内に保存した。この方法での凍結速度は速度調整フリーザーの4倍である。

凍結細胞を回収するため、バイアルを 37°C の水で、最後の氷結晶が消えるまで静かに攪拌しながら解冻した。解冻したバイアルを氷水中に浸し、5分以内に細胞を15%仔牛血清を含む同量の冷培養液で静かに希釈し、両者を十分に混和させた。これを更に2回繰り返す、最終希釈率を 1:8~1:12 とした。この浮遊液を遠心分離によって2度洗浄し、細胞をテスト培養液で再浮遊し、生存率、回収率及び細胞傷害活性を調べた。解冻細胞の生存率は、非感作細胞で $86.5 \pm 8.1\%$ 、感作細胞で $84.6 \pm 6.7\%$ であり、回収率は、非感作細胞で $53.6 \pm 14.7\%$ 、感作細胞で $62.4 \pm 14.1\%$ であった。

細胞培養. 7人の健常提供者から得た細かく切り刻んだ組織片を用いて、正常皮膚線維芽細胞の培養を開始した。培養は MEM に 1% 非必須アミノ酸、2 mM 新鮮 L-グルタミン、1% P/S 及びブスクリーニング済みの 15% 仔牛血清を加えた完全培養液で行った。汚染を示す培養標本は廃棄した。これらの線維芽細胞は、マイクロ細胞傷害テストにおける単層培養標的細胞として用い、また、試験管内で2継代から17継代のものを試験管内感作における HLA-SD 抗原源として用いた。

^3H -プロリン細胞性細胞傷害マイクロテスト. 培養皮膚線維芽細胞を ^3H -プロリン $50 \mu\text{Ci/ml}$ (比活性 $21.9\sim 24.6 \text{ Ci/mmol}$) で一晚標識し、トリプシン処理し、テスト培養液で再浮遊した後、マイクロテストプレートに、1穴当たり1,000個の生存標識標的細胞を分注した(これについては別に述べた)。^{17,20-24} 特に断わらないかぎり、1個の標的細胞に対し、250個のエフェクター細胞の比率で、 ^3H -プロリン細胞性細胞傷害テストに用いた。5% CO_2 及び 37°C の加湿空气中に40時間培養した後、非附着

target cells and effector cells were washed away with 37°C phosphate-buffered saline containing 5% FCS. Then, the residual radioactivity (counts per minute) of cells attached to each well was measured to indicate the number of viable target cells remaining. Four or five replicates per sample were tested on control target monolayer cells autologous to responder donors IVS as well as test target monolayer cells autologous to stimulator donors.

Analysis. Percent CMC (% reduction of target cells) was calculated as $[1-(b)/(a)] \times 100$, where (a)=mean count per minute (cpm) of target monolayer incubated with effector cells from unsensitized culture, and (b)=mean cpm of target monolayer incubated with effector cells from sensitized culture. Here, for positive CTX of effector cells, more than 30% reduction of target cells and significant difference (at $p < 0.05$ by t-test) from mean cpm of five replicates of target monolayer incubated with medium alone were used.

For the determination of specific CTX by effector cells from sensitization culture, negative CTX (<30% reduction of target monolayer) against control target and positive CTX ($\geq 30\%$ reduction) against test target were considered.

RESULTS

Time Course of Primary and Secondary Mixed Lymphocyte Culture. These studies were performed in microtest plates. All cultures were set up in triplicate containing 125×10^3 responding cells and 125×10^3 irradiated (2,250 rad) stimulating cells in 0.2 ml of test medium, cultured for 1 to 15 days, and labelled with $^3\text{H-TdR}$ for 18 hours at a final concentration of $0.5 \mu\text{Ci/well}$ ($2.5 \mu\text{Ci/ml}$). The proliferative response was quantitated by scintillation counting of incorporated $^3\text{H-TdR}$.

Figure 1 shows that primary MLC response reached a peak on the 7th day and subsequently declined and became zero, or weak, around the 12th day. When primary MLC cells were restimulated by cells autologous to primary stimulating cells (Figure 2), secondary proliferative response was induced and reached a peak within 2-3 days. These responses were confined to alloantigens of the original stimulator cells.

死亡標的細胞及びエフェクター細胞を、5%仔牛血清を含む37°Cリン酸緩衝食塩水で洗い流した。次に、各穴に付着している細胞の残存放射能(毎分のカウント)を測定し、生き残った標的細胞の数を示した。検体一つにつき4ないし5個の重複検査を、刺激細胞提供者由来の試験標的単層細胞と同様、試験管内感作における応答細胞提供者由来の対照標的単層細胞について行った。

解析. 細胞性細胞傷害率(標的細胞の減少率)は $[1-(b)/(a)] \times 100$ で計算した。ただし、(a)は非感作培養から得たエフェクター細胞とともに培養した標的単層細胞の1分当たりのカウント(cpm)を示し、(b)は、感作培養で得られたエフェクター細胞とともに培養した標的単層細胞の平均cpmを示す。ここで、エフェクター細胞の細胞傷害性陽性とは、培養液のみで培養した標的単層細胞の五つの重複検査の平均cpmと比べてエフェクター細胞を加えた場合標的細胞に30%以上の減少があり有意差(tテストでは $p < 0.05$)がある場合である。

感作培養で得られたエフェクター細胞による特異的細胞傷害性の判定は、対照標的細胞に対する細胞傷害性陰性(標的単層細胞30%以下の減少)及びテスト標的細胞に対する細胞傷害性陽性(30%以上の減少)の場合特異的とした。

結果

第一次及び第二次混合リンパ球培養の経時変動。この研究はマイクロテストプレートで行った。テスト培養液0.2mlに、125,000の反応細胞と125,000の放射線照射(2,250rad)刺激細胞を含む培養標本を3組作成し、1~15日間培養した後、 $^3\text{H-TdR}$ で18時間、最終濃度 $0.5 \mu\text{Ci/穴}$ ($2.5 \mu\text{Ci/ml}$)で標識した。増殖反応は、取り込んだ $^3\text{H-TdR}$ のシンチレーション・カウントで定量化した。

図1は、混合リンパ球培養一次反応が7日目にピークに達し、その後下降し、12日目ころ0になるか又は減弱したことを示している。一次混合リンパ球培養細胞が、一次刺激細胞由来細胞によって再度刺激された場合(図2)、二次増殖反応が誘発され、2~3日以内にピークに達した。これらの反応は、本来の刺激細胞のアロ抗原に限定された。

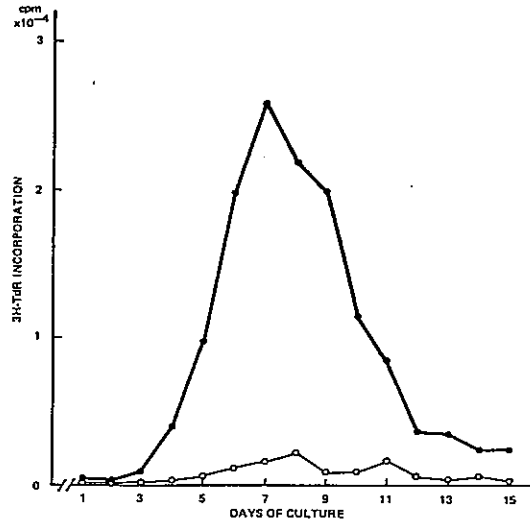


Figure 1. Time course of primary mixed lymphocyte culture. For standard one-way MLC testing, triplicate cultures containing a mixture of 125,000 responding cells from C.S. and 125,000 stimulating cells (irradiated with 2250 rad) from C.S. (○—○) or J.M. (●—●) in 0.2 ml of test medium were prepared in wells of microtest plates. ³H-thymidine (0.5 μCi/well, specific activity 5 Ci/mmole) was added to each culture 18 hours before harvesting on each day. The data show mean counts per minute of triplicate cultures.

図1 混合リンパ球一次培養の経時変動。標準 one-way 混合リンパ球培養テストにおいて、マイクロテストプレートの穴に、0.2ml のテスト培養液中に、C.S. からの125,000個の反応細胞及び、C.S. (○—○)又はJ.M. (●—●)からの125,000個の刺激細胞(2,250radの放射線を照射)を含む混合液の3重複培養標本を作成した。毎日の細胞採取の18時間前に、³H-チミジン(0.5μCi/穴、比活性5 Ci/mmole)を各培養標本に加えた。データは、3組の培養標本の1分当たりの平均カウントを示している。

Detection of Cell-mediated Cytotoxicity in Effector Cells Sensitized In Vitro. In vitro generation of cytotoxic lymphocytes was performed in culture flasks under conditions similar to those used for MLC in microtest plates in order to maintain comparable culture conditions between the systems. The responder cell density and amount per medium surface area of culture flasks were kept constant (i.e., 125×10^3 responding cells in 0.2 ml of test medium per 0.282 cm^2 of surface area of culture flasks).

In microcytotoxicity testing, 250×10^3 effector cells were incubated with $1,000$ ³H-proline pre-labelled target cells.

Figure 3A shows, that as compared with destruction of target cells by unsensitized cells, effector cells sensitized to allogeneic cells for 3-6 days

試験管内で感作されたエフェクター細胞による細胞性細胞傷害性の検討。細胞傷害性リンパ球の試験管内誘導を、培養フラスコ内で、マイクロテストプレート上の混合リンパ球培養に使用したと同様の条件下で行った。これは、両培養系間の条件を比較可能にしておくためである。培養フラスコの培地表面積当たりの反応細胞濃度及び量を一定に保った(培養フラスコ表面積 0.282 cm^2 当たりのテスト培養液0.2mlにおいて反応細胞は125,000個)。

マイクロ細胞傷害テストにおいては、250,000個のエフェクター細胞を³H-プロリンで標識済みの1,000個の標的細胞とともに培養した。

図3Aは、非感作細胞による標的細胞の破壊と比較して、3～6日間同種リンパ球に感作したエフェ

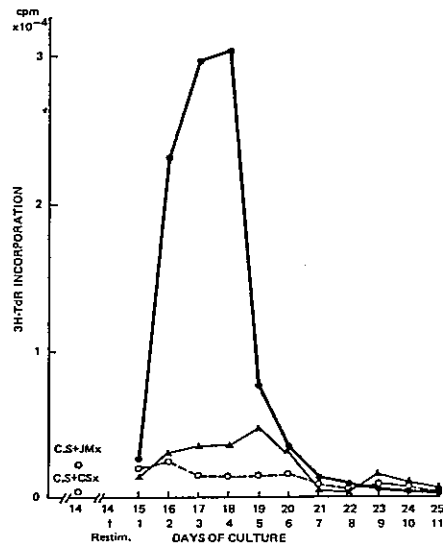


Figure 2. Time course of secondary mixed lymphocyte culture restimulated on day 14 of primary MLC. For secondary MLC testing, triplicate cultures containing a mixture of 125,000 14-day primary MLC cells and 125,000 stimulating cells (irradiated with 2250 rad) in 0.2 ml of test medium were prepared in wells of microtest plates. (C.S. + J.Mx) + C.Sx, ○—○; (C.S. + J.Mx) + J.Mx, ●—●; and (C.S. + J.Mx) + Y.Kx, ▲—▲. ³H-thymidine was added to each culture 18 hours before harvesting on each day. The data show mean counts per minute of triplicate cultures.

図2 混合リンパ球一次培養の14日目に再刺激された混合リンパ球二次培養の経時変動。混合リンパ球二次培養テストにおいてマイクロテストプレートの穴に、0.2ml テスト培養液中に、125,000個の混合リンパ球14日間一次培養細胞と125,000個の刺激細胞(2,250radの放射線を照射)を含む混合液の3重複製培養標本を作成した。(C.S.+J.Mx)+C.Sxは○—○で示し、(C.S.+J.Mx)+J.Mxは●—●で、(C.S.+J.Mx)+Y.Kxは▲—▲で示した。毎日採取の18時間前に、³H-チミジンをそれぞれの培養標本に添加した。データは、3重複製培養標本の1分当たりの平均カウントを示している。

strongly destroyed both target cells autologous to responder cells and target cells autologous to stimulator cells. But in the following days, CTX to target cells autologous to responder cells (nonspecific CTX) decreased. In contrast to this nonspecific CTX, specific CTX to test target cells autologous to stimulator cells came to be detected after 7 days of sensitization (6 of 18 tests by effector cells sensitized for 7 days). After this, detection of the specific CTX became more clear by effector cells sensitized for 8 or 9-11 days, and subsequently in 12-14 days generation, CTX against both target cells became weak or negative (less by 30% or more compared with unsensitized cells).

To reduce blastogenesis by responder cells, which may cause nonspecific reactivity, the ratio of responder to stimulator cells in the primary MLC

クター細胞は、反応細胞由来の標的細胞及び刺激細胞由来の標的細胞の両者を著しく破壊したことを示している。しかし、それ以降反応細胞由来の標的細胞に対する細胞傷害(非特異的細胞傷害)は低下した。この非特異的細胞傷害とは対照的に、刺激細胞由来のテスト標的細胞に対する細胞傷害は感作の7日後に検出され始めた(7日間感作したエフェクター細胞による18のテストのうちの6)。この後、特異的細胞障害の探知は、8ないし9~11日間感作したエフェクター細胞により更に明確になり、その後12~14日の誘導で、両方の標的細胞に対する細胞傷害は弱くなるか陰性となった(非感作細胞と比較して30%以下減弱)。

反応細胞によって、非特異的反応性を起こすと思われる芽球化を減弱させるために、一次混合リンパ球培養における反応細胞と刺激細胞の比率を変動させ

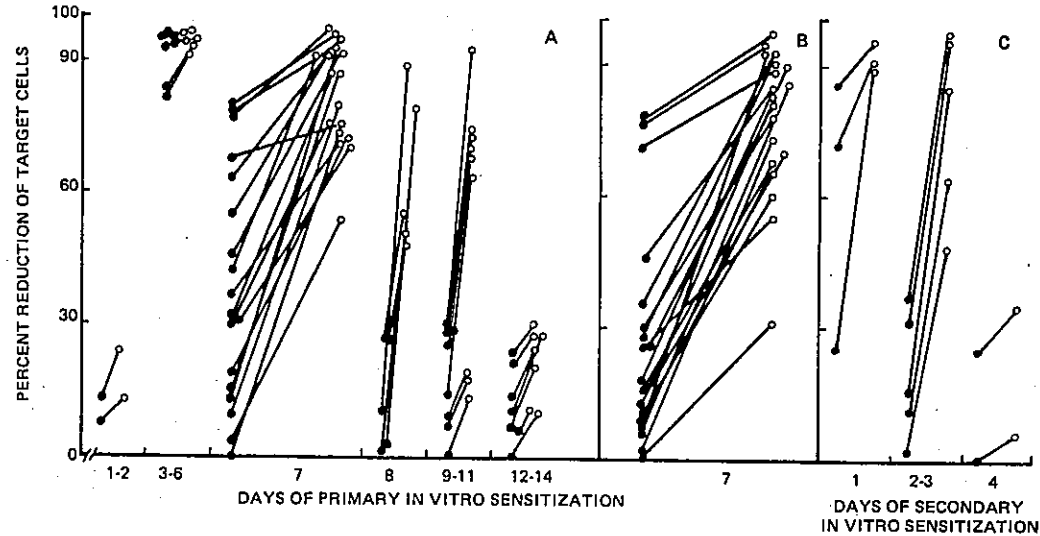


Figure 3 Cytotoxicity of effector cells generated for various times of in vitro sensitization. Cytotoxicity tests were performed as described in the text. Effector cells were prepared at various periods of MLC. 250,000 effector cells (per well) were incubated with 1,000 ^3H -proline prelabeled fibroblast target cells for 40 hours. The data show percent reduction of target cells by sensitized effector cells compared to unsensitized cells against target cells autologous to responder cells (●), and to stimulator cells (○). Primary in vitro sensitization was done with 1:1 ratio of responder and stimulator cells (A), and 1:0.5 ratio (B) as described in the text. Secondary in vitro sensitization was done with 1:1 ratio of 10-day primary IVS cells and stimulator cells.

図3 異なる時間の試験管内感作で誘導されたエフェクター細胞の細胞傷害。本文で述べたような方法で、細胞傷害テストを行った。異なる期間の混合リンパ球培養で得られたエフェクター細胞を使った。40時間 ^3H -プロリンで標識した1,000個の線維芽標的細胞とともに、1穴当たり250,000個のエフェクター細胞を培養した。このデータは、反応細胞(●)及び刺激細胞(○)由来の標的細胞に対する非感作細胞と比較した感作エフェクター細胞による標的細胞の減少率を示している。本文に述べたように、反応細胞対刺激細胞が1:1(A)及び1:0.5(B)の比率で試験管内一次感作を行った。試験管内二次感作は、試験管内10日間一次感作細胞対刺激細胞を1:1の比率で行った。

$$\% \text{ cytotoxicity} = \left(1 - \frac{\text{mean cpm with effector cells from resensitized culture}}{\text{mean cpm with effector cells from unsensitized culture}} \right) \times 100$$

$$\% \text{ 細胞傷害性} = \left(1 - \frac{\text{再感作培養からのエフェクター細胞による平均 cpm}}{\text{非感作培養からのエフェクター細胞による平均 cpm}} \right) \times 100$$

was varied. At the ratio of two responder cells to one stimulator cell, less blastogenesis was usually seen (data not shown), but rather strongly reactive specific cytotoxic lymphocytes were seen seven days after primary stimulation, with decreasing changes of nonspecific CTX, i.e., decreasing from 12 of 18 nonspecific CTX tests at 1:1 ratio (Figure 3A) to 5 of 19 tests at 1:0.5 ratio (Figure 3B).

Figure 3C shows CTX test by effector cells generated in secondary stimulation of 10-day primed MLC. There was a rapid increase of specific CTX without much nonspecific CTX at 2-3 days after restimulation.

Possibility of Preserving Specific Cytotoxicity. Cryopreservation of effector cells was studied in order to determine whether their cytotoxic activities could be maintained. In the method used here, cryopreservation was made at a relatively rapid rate. The cells in nunc vials were placed in a -80°C freezer overnight prior to transferring into liquid nitrogen. Freezing by this system, made at a rate of $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ from $+4^{\circ}\text{C}$ to -40°C , was four times faster compared with a programmed freezer.

Table 2 shows two representative experiments on CTX of cryopreserved effector cells. Effector cells in experiment 1 were prepared from 7-day primary MLC. Responder M.B. stimulated with J.Mx killed only J.M. fibroblasts. They did not kill autologous M.B. fibroblasts. Experiment 2 presents the CTX of three-day cultured secondary stimulated lymphocytes. Although the responder (J.M.+M.Bx) restimulated with J.Mx did not destroy any target cells significantly as compared with J.M. alone cultured for 13 days, (J.M.+M.Bx) restimulated with M.Bx specifically killed target M.B. fibroblasts.

Figure 4 summarized the CTX of cryopreserved effector cells generated under several conditions of MLC. Effector cells sensitized for 5-6 days still showed high CTX against target cells autologous to both responder and stimulator cells, as did unfrozen effector cells generated for the same period in MLC. In contrast, 7-8 day sensitized cells killed target cells autologous to responder cells less (0 of 14 tests showed $\geq 30\%$ reduction), but killed target cells autologous to stimulator cells strongly (13 of 14 tests showed $\geq 30\%$ reduction, mean 51.3%). Effector cells

た。反応細胞対刺激細胞の比率が2:1の場合、芽球化は通常あまり見られなかった(データは示していない)が、かなり反応性の強い特異的細胞傷害リンパ球が、一次刺激の7日後に見られ、非特異的細胞障害の低下が認められた。すなわち、1:1の比率における18テスト中12に認められた非特異的細胞傷害性から(図3A)、1:0.5の比率では19のテストが5に減少した(図3B)。

図3Cには、10日間感作した混合リンパ球の二次刺激において誘導されたエフェクター細胞による細胞傷害テストの結果を示した。再刺激の2~3日後、非特異的細胞傷害はあまりなく、特異的細胞傷害の急激な増加が見られた。

特異的細胞傷害性保持の可能性。 エフェクター細胞の細胞傷害活性が保持できるか否かを調べるため、同細胞の凍結保存について研究した。ここで用いた方法では、凍結保存は比較的速い速度で行われた。nuncバイアルに入れた細胞を -80°C のフリーザーに一晩置き、次にそれを液体窒素に移した。 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で $+4^{\circ}\text{C}$ から -40°C で行うこの冷凍方法は、プログラムされたフリーザーと比較して4倍速い。

表2には、凍結保存したエフェクター細胞の細胞傷害に関する二つの代表的な実験を示した。実験1のエフェクター細胞は、7日間感作した一次混合リンパ球培養から得られた。J.Mxで刺激された反応細胞M.B.はJ.M.線維芽細胞のみを殺し、自己M.B.線維芽細胞は殺さなかった。実験2は、3日間培養した二次刺激リンパ球の細胞傷害を示している。J.Mで再刺激された反応細胞(J.M.+M.Bx)は、13日間培養されたJ.M.のみと比較して、著しく標的細胞を破壊することはなかったが、M.Bxで再刺激された(J.M.+M.Bx)は標的M.B.線維芽細胞を特異的に殺した。

図4は、混合リンパ球培養の幾つかの条件下で誘導された凍結エフェクター細胞の細胞傷害を要約したものである。5~6日間感作されたエフェクター細胞は、反応細胞由来及び刺激細胞由来の標的細胞に対してなおも高い細胞傷害を示したが、これは、同期間中混合リンパ球培養で誘導された非凍結エフェクター細胞の場合と同様であった。これと対照的に、7~8日間感作された細胞は、反応細胞由来の標的細胞を殺すことは少なかった(14のテストで30%以上の減弱を示したものはない)が、刺激細胞由来の標的細胞を著しく殺した(14のテスト中13で30%以上の減弱が示された。平均は51.3%)。1:0.25及び

TABLE 2 REPRESENTATIVE EXPERIMENTS ON CYTOTOXIC ACTIVITY OF
CRYOPRESERVED IN VITRO SENSITIZED CELLS

表2 試験管内凍結保存感作細胞の細胞傷害活性に関する
実験の代表例

Experiment No.	Effector Cells ¹⁾ (250 × 10 ³ cells/well)	³ H-TdR Uptake ²⁾	Target Cells ³⁾ (1000 cells/well)	
			M.B. Fibroblast (A2, -, B7, B12, CW5) ⁵⁾	J.M. Fibroblast (A1, AW24, B8, B15) ⁵⁾
1	M.B. Alone Day 7	6220 ± 129	4028 ± 202	3124 ± 108
	M.B. + J.Mx	59672 ± 1325	3753 ± 509	1303 ± 50*
	J.M. + PHA ⁴⁾	—	1596 ± 169*	1144 ± 112*
	Medium Alone	—	4713 ± 90	3568 ± 84
2	J.M. Alone Day 13	—	2070 ± 186	2889 ± 100
	(J.M. + M.Bx) + J.Mx	8456 ± 423	1650 ± 144	2528 ± 139
	(J.M. + M.Bx) + M.Bx	38392 ± 906	964 ± 76*	2411 ± 153
	M.B. + PHA ⁴⁾	—	202 ± 43*	333 ± 21*
	Medium Alone	—	2554 ± 83	3654 ± 59

1) Effector cells were prepared from 7-day primary in vitro sensitization with 1:1 ratio of responder and stimulator cells for exp. 1 and from 3-day secondary in vitro sensitization with 1:1 ratio of 10-day primed (J.M. + M.Bx) and stimulator cells for exp. 2. x after stimulator cells indicates irradiation with 2250 rad.

実験1では、反応細胞対刺激細胞を1:1の比率で7日間の試験管内一次感作によって得たエフェクター細胞を使った。実験2では、10日間感作細胞(J.M. + M.Bx)対刺激細胞を1:1の比率で3日間の試験管内二次感作によって得たものを使った。刺激細胞の後のxは2,250radの放射線照射を示す。

2) ³H-thymidine incorporation was measured before freezing effector cells, mean cpm ± standard error of triplicate samples from culture flasks.

エフェクター細胞を冷凍する前に、³Hチミジン取り込みを測定した。培養フラスコから3重複標本を作り、その平均cpm ± 標準誤差で表した。

3) 1000 target cells prelabeled with ³H-proline were seeded in wells of Falcon 3040 microtest plates. Mean cpm ± standard error of five replicates of remaining target cells after 40 hours incubation with effector cells.

³Hプロリンであらかじめ標識した1,000個の標的細胞を、Falcon 3040マイクロテストプレートの穴に分注した。エフェクター細胞で40時間培養して残った標的細胞の5重複標本の平均cpm ± 標準誤差で表した。

4) Phytohemagglutinin-P (1:800) was added to induce cytotoxicity to freshly prepared lymphocytes.

植物性血球凝集素 PHA-P (1:800) を、細胞傷害性を誘発させるため、新たに用意したリンパ球に加えた。

5) HLA locus antigens.

HLA 遺伝子座抗原

* Significant cytotoxicity (≥30% reduction compared with unsensitized control cells and P<0.05 by students "t" test).

細胞傷害性の有意性(非感作対照細胞と比較して30%以上の減少。Student の t テストでは P<0.05.)

from 1:0.25 and 1:0.5 ratios of responder and stimulator cells also killed only target cells autologous to stimulator cells, but the frequency and magnitude of the CTX were low and weak as compared with effector cells from 1:1 ratio (6 of 16 tests showed ≥30% reduction, mean of 26.2%, and 11 of 20 tests, mean of 34.3%).

1:0.5の比率の反応細胞及び刺激細胞から得られるエフェクター細胞も刺激細胞由来の標的細胞のみを殺したが、1:1の比率で得られるエフェクター細胞と比較すると、細胞傷害の頻度と程度は低く、弱かった(16のテスト中6が30%以上減弱を示し、平均値は26.2%、20のテスト中11の場合、平均値は34.3%)。

Comparison of Activity of Unfrozen and Cryopreserved Effector Cells in Cell-mediated Cytotoxicity. Since specific CTX was cryopreserved, comparative studies on CMC of unfrozen

非凍結エフェクター細胞と凍結保存エフェクター細胞における細胞性細胞傷害活性の比較。特異的細胞傷害が凍結保存されたので、細胞性細胞傷害に

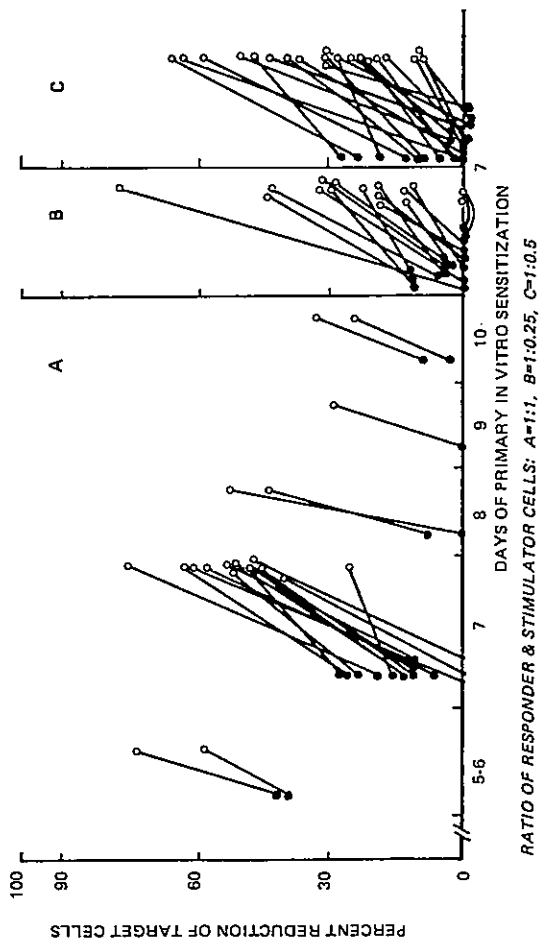


Figure 4. Cytotoxic activity of cryopreserved effector cells generated for various times of in vitro sensitization. Cytotoxicity tests were performed as described in the text. 250,000 cryopreserved effector cells were incubated with 1,000 ^3H -proline prelabeled fibroblast target cells for 40 hours. The data showed percent reduction of target cells by sensitized effector cells compared to unsensitized cells against target cells autologous to responder cells (●), and to stimulator cells (○).

図4 異なる時間の試験管内感作で誘導された凍結保存エフェクター細胞の細胞傷害活性。本文に述べたような方法で細胞傷害テストを行った。40時間 ^3H -プロリンで標識した1,000個の線維芽標的細胞とともに、250,000個の凍結保存エフェクター細胞を培養した。このデータは、反応細胞(●)及び刺激細胞(○)由来の標的細胞に対する非感作細胞と比較して、感作細胞による標的細胞の減少率を示したものである。

TABLE 3 COMPARISON OF CYTOTOXIC ACTIVITY OF UNFROZEN AND CRYOPRESERVED EFFECTOR CELLS GENERATED IN IN VITRO SENSITIZATION

表3 試験管内感作により誘導された非凍結エフェクター細胞及び凍結保存エフェクター細胞の細胞傷害活性の比較

Experiment No.	Effector Cells ¹⁾ (250 × 10 ³ cells/well)	³ H-TdR Uptake	Target Cell (1000 cells/well)							
			J.M. Fibroblast (A1, AW24, B8, B15)		M.B. Fibroblast (A2, -, B7, B12, CWS)		C.S. Fibroblast (A2, A29, B12, -)		J.E. Fibroblast (A2, A10, B12, B27, CW1)	
			Unfrozen Effector Cells	Cryo-preserved Effector Cells	Unfrozen Effector Cells	Cryo-preserved Effector Cells	Unfrozen Effector Cells	Cryo-preserved Effector Cells	Unfrozen Effector Cells	Cryo-preserved Effector Cells
1	M.B. + M.Bx	238 ± 22	1464 ± 19	1454 ± 34	2747 ± 43	2353 ± 73				
	M.B. + J.Mx	23557 ± 484	232 ± 10*	992 ± 21*	2591 ± 52	2406 ± 76				
	Medium Alone	-	1533 ± 19	1498 ± 21	2985 ± 71	2588 ± 31				
2	C.S. Alone	55 ± 11	1988 ± 130	1906 ± 39			1385 ± 37	1143 ± 35		
	C.S. + J.Mx	5817 ± 337	801 ± 54*	1300 ± 70*			1238 ± 13	1040 ± 28		
	Medium Alone	-	2334 ± 44	2154 ± 67			1391 ± 71	1189 ± 45		
	C.S. + PHA	-	385 ± 117*	515 ± 51*			110 ± 5*	197 ± 23*		
3	M.B. Alone	176 ± 30			2358 ± 40	2548 ± 48	1567 ± 37	1436 ± 22	1144 ± 41	1214 ± 39
	M.B. + C.Sx	48205 ± 4062			2008 ± 41	2245 ± 79	198 ± 18*	850 ± 18*		
	M.B. + J.Ex	10710 ± 350			2034 ± 33	2263 ± 51			89 ± 9*	603 ± 22*
	Medium Alone	-			2562 ± 72	2816 ± 74	1714 ± 57	1615 ± 49	1166 ± 30	1215 ± 21

1) Effector cells were prepared from 7-day primary in vitro sensitization with 1:0.5 ratio of responder and stimulator cells for exp. 1 and 2, and with 1:1 ratio for exp. 3. x after stimulator cells means irradiations with 2250 rad. The effector cells were divided into unfrozen and cryopreserved cells, used at the same time. In exp. 1 and 2 cryopreserved effector cells were frozen in revco (-80°C) overnight, then thawed. Unfrozen effector cells were stored overnight in a 5% CO₂ bag at room temperature, and in exp. 3 were frozen in revco for 2 hours, then thawed.

実験1及び2では、反応細胞封刺細胞を1:0.5の比率で7日間の試験管内一次感作によって得られたエフェクター細胞を使った。実験3では比率1:1の条件のものを使った。刺細胞の後に付けたxは、2,250radの放射線照射を示す。エフェクター細胞は非凍結細胞と凍結保存細胞とに分け、同時に使用した。実験1及び2においては、凍結保存エフェクター細胞を一晩 Revco 内(-80°C)で冷凍し、その後解凍した。非凍結エフェクター細胞は、室温で5% CO₂充満の袋に入れ一晩保存し、実験3では Revco 内で2時間冷凍し、その後解凍した。

* See Table 2. 表2参照

and cryopreserved effector cells were made in order to determine the effect of cryopreservation on cytotoxic activity.

The results of three representative experiments presenting the effects of cryopreservation on specific CMC are shown in Table 3. Effector cells in experiments 1 and 2 were obtained from 7 day MLC with 1:0.5 ratio of responder and stimulator cells, and those in experiment 3 were obtained from 7 days MLC with 1:1 ratio of the two cells. Although the cryopreserved sensitized cells showed weaker activity against both control and specific target cells than unfrozen sensitized cells did, the cryopreserved effector cells were still highly and selectively reactive for the target cells autologous to stimulator cells.

Table 4 shows the effect of cryopreservation on CTX of sensitized cells against target cells autologous to responder cells (nonspecific CTX). Unfrozen effector cells of M.C.+T.Px and M.C.+J.Ex in experiment 1 and T.P.+M.Cx and T.P.+J.Ex in experiment 2 showed highly nonspecific CTX against all of the target cells, but when these effector cells were frozen and thawed, they came to kill selective target cells autologous to stimulator cells in each MLC; they did not destroy target cells which were autologous to responder cells and those which had different HLA-SD antigens recognized by responder cells.

Figure 5 presents a summary of comparative studies made on CTX of unfrozen and cryopreserved effector cells prepared from 7-day primary MLC. As seen in Figure 5A, some unfrozen effector cells obtained from 1:0.5 ratio of responder and stimulator cells killed more than 30% of control target cells compared with unsensitized cells (4 of 13 tests), but after freezing and thawing of these cells, reduction of target cells never exceeded 30%. Although all of the unfrozen effector cells killed test target cells at a high rate, 6 of 13 cryopreserved effector cells did not kill more than 30%. In Figure 5B, unfrozen effector cells generated with 1:1 ratio of responder and stimulator cells showed strong nonselective patterns of CTX, but, when cryopreserved, the same effector cells presented highly selective killing of test target cells. The frequency of 30% reduction of target cells and magnitude of CTX of cryopreserved cells against test target cells was 7 of 13 tests and with a mean of $31.4 \pm 16.5\%$ reduction by effector cells from

関して、非凍結エフェクター細胞と凍結保存エフェクター細胞との比較研究を行い、凍結保存が細胞傷害活性に与える影響を調べた。

特異的細胞性細胞傷害に対する凍結保存の影響を示す代表的な三つの実験の結果を表3に示した。実験1及び2のエフェクター細胞は、反応細胞対刺激細胞の比率1:0.5で7日間の混合リンパ球培養から得た。実験3のエフェクター細胞は、上記の細胞が1:1の比率で同期間の培養から得た。凍結保存した感作細胞は、非凍結感作細胞より、対照標的細胞及び特異的標的細胞に対する活性は弱い。凍結エフェクター細胞は、刺激細胞由来の標的細胞に対して著しくしかも選択的に反応を示した。

表4は、反応細胞由来の標的細胞に対する感作細胞の細胞傷害能に及ぼす凍結保存の影響を示したものである(非特異的細胞傷害)。実験1におけるM.C.+T.Px及びM.C.+J.Exの非凍結エフェクター細胞と、実験2におけるT.P.+M.Cx及びT.P.+J.Exの非凍結エフェクター細胞は、標的細胞全部に対する非特異的細胞傷害が高かったけれども、これらのエフェクター細胞を凍結した後解凍すると、同細胞は、それぞれの混合リンパ球培養における刺激細胞由来の特定の標的細胞を殺すようになった。しかし、反応細胞由来の標的細胞や、反応細胞によって認識された異なるHLA-SD抗原をもつ標的細胞を破壊することはなかった。

図5は、7日間培養の混合リンパ球一次培養で得られた非凍結エフェクター細胞と凍結エフェクター細胞の細胞傷害に関して行った比較研究の概略を示したものである。図5Aに見られるように、反応細胞対刺激細胞の比率が1:0.5の場合、得られた非凍結エフェクター細胞の幾らかは、非感作細胞と比較して対照標的細胞を30%以上も殺したが(13のテストのうち4)、これらの細胞を凍結し、解凍した後では、標的細胞の減少は30%を超えることはなかった。すべての非凍結エフェクター細胞は、高率でテスト標的細胞を殺したが、凍結保存エフェクター細胞は13のテスト中6では標的細胞を30%以上殺さなかった。図5Bでは、反応細胞対刺激細胞の比率が1:1で誘導された非凍結エフェクター細胞は、強い、非選択的な細胞障害パターンを示したが、同じエフェクター細胞が凍結保存されると、テスト標的細胞に対して、強い選択的殺傷力を示した。テスト標的細胞に対する凍結保存細胞の細胞障害の30%減弱の頻度及び程度は、混合リンパ球培養1:0.5の比率で得られるエフェクター細胞では13のテスト中7で

TABLE 4 EFFECT OF CRYOPRESERVATION ON CYTOTOXIC ACTIVITY OF EFFECTOR CELLS

表4 エフェクター細胞の細胞傷害活性に対する凍結保存の影響

Experiment No.	Effector Cells (250 × 10 ³ cells/well)	³ H-TdR Uptake	Target Cell (1000 cells/well)					
			M.C. Fibroblast (A2, A29, B12, -)		T.P. Fibroblast (A11, AW24, B12, B40)		J.E. Fibroblast (A2, A10, B12, B27, CW1)	
			Unfrozen Effector Cells	Cryo-preserved Effector Cells	Unfrozen Effector Cells	Cryo-preserved Effector Cells	Unfrozen Effector Cells	Cryo-preserved Effector Cells
1	M.C. + M.Cx	675 ± 25	3280 ± 122	2873 ± 152	2030 ± 93	1952 ± 96	1010 ± 27	989 ± 43
	M.C. + T.Px	53168 ± 2004	2275 ± 71*	3467 ± 81	492 ± 43*	1152 ± 43*	578 ± 19*	957 ± 35
	M.C. + J.Ex	28030 ± 474	1892 ± 96*	2483 ± 55	1201 ± 37*	1877 ± 70	86 ± 4*	462 ± 23*
	M.A. + PHA Medium Alone		867 ± 46 3526 ± 77		684 ± 48 2302 ± 90		99 ± 4 1169 ± 37	
2	T.P. Alone	2129 ± 51	3801 ± 110	4304 ± 157	2467 ± 27	2140 ± 154	1168 ± 19	1018 ± 58
	T.P. + M.Cx	56594 ± 1097	1122 ± 89*	2207 ± 82*	1706 ± 28*	2240 ± 63	229 ± 9*	568 ± 72*
	T.P. + J.Ex	57031 ± 562	1724 ± 142*	3004 ± 127*	1680 ± 83*	2193 ± 62	153 ± 14*	391 ± 33*
	M.A. + PHA Medium Alone		1150 ± 67 4138 ± 93		943 ± 126 2615 ± 70		132 ± 18 1144 ± 18	

Effector cells were prepared from 7-day primary in vitro sensitization with 1:1 ratio of responder and stimulator cells. x after stimulator cells means irradiation at 2250 rad. Cryopreserved effector cells were divided into unfrozen and cryopreserved cells from the same culture system. Cytotoxicity test were performed at the same time.

反応細胞対刺激細胞を1:1の比率で7日間の試験管内一次感作によって得たエフェクター細胞を使った。刺激細胞の後に付けたxは2,250radの放射線照射を意味する。凍結保存エフェクター細胞は、同じ培養系の非凍結細胞と凍結保存細胞とに分けた。細胞傷害性テストは同時に行った。

* See Table 2. 表2参照

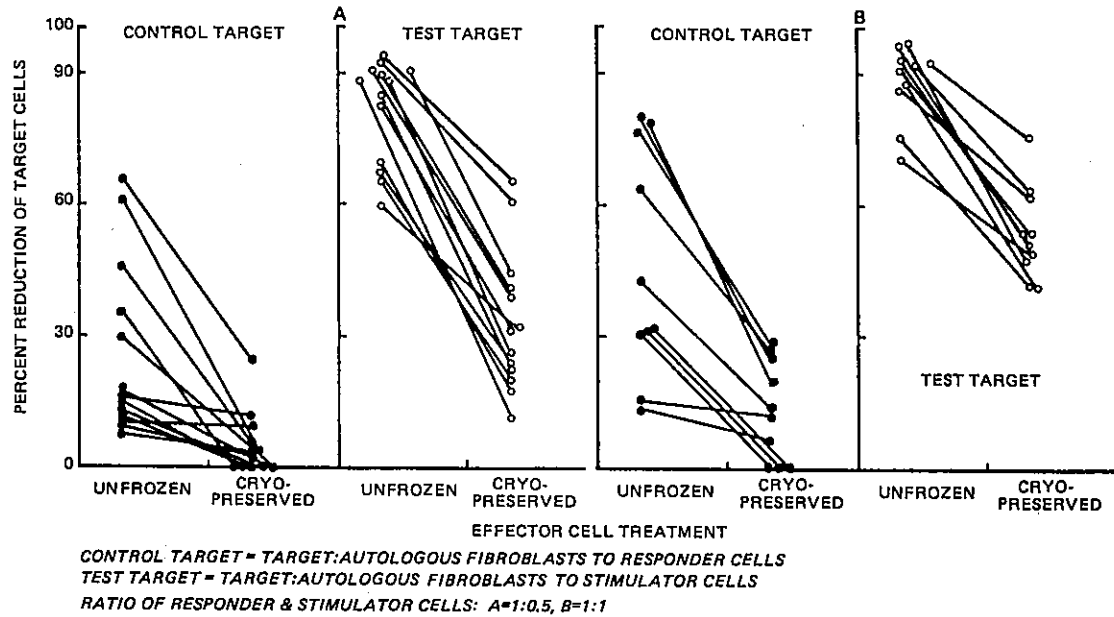


Figure 5. Comparative studies on cytotoxic activity of unfrozen and cryopreserved effector cells generated in 7-day primary MLC. Cytotoxicity tests were performed as described in the text, with 250,000 effector cells and 1,000 target cells prelabeled with ³H-proline in microtest plates. Effector cells generated in 7-day primary MLC were divided into unfrozen and cryopreserved cells from same culture systems. These effector cells were used at the same time or at different times against the same donor's fibroblast target cells.

図5 混合リンパ球7日間一次培養で誘導された非凍結エフェクター細胞と凍結保存エフェクター細胞の細胞傷害活性の比較研究。本文で述べたように、250,000個のエフェクター細胞と³H-プロリンで標識した1,000個の標的細胞でマイクロテストプレートで、細胞傷害性テストを行った。混合リンパ球7日間一次培養で誘導されたエフェクター細胞は、同じ培養系の非凍結細胞と凍結保存細胞とに分けた。これらのエフェクター細胞は、同一提供者の線維芽標的細胞に対して同じか又は異なる時間に用いられた。

1:0.5 ratio of MLC, and 10 of 10 tests with a mean of $53.5 \pm 10.7\%$ reduction by effector cells from 1:1 ratio of MLC.

Generation of Cytotoxic Lymphocytes Against Monolayer Cultured Fibroblasts Used as Stimulator Cells. Since specific CTX to monolayer target cells can now be detected, the conditions necessary to generate cytotoxic cells against monolayer cultured cells used as stimulator cells were studied. For this model, allogeneic fibroblasts were used as the stimulator cells for generation of cytotoxic cells, as they are known to bear HLA-SD surface antigens. Thus, they serve as a model for tumor cells bearing SD antigens which include tumor antigens. As shown in Table 5, when responder cells were cultured with only fibroblasts there was little or no blastogenesis or development of cytotoxic cells. Based on the findings of Eijssvoegel et al²⁵ and Zarling et al²⁶ on the two-signal stimulus necessary for proliferation and generation of cytotoxic cells, third party experiments were performed. In this model, M.B. responder cells were cultured with C.Sx lymphocytes as a source of lymphocyte-defined antigens to trigger the proliferation of responder cells in order to differentiate cytotoxic cells to the SD antigens present on the J.E. fibroblasts (experiment 1).

Donors M.B., C.S., and J.E. were not HLA identical. After seven days in vitro MLC, unfrozen effector cells were used for the testing of CMC on fibroblast targets from donors M.B., C.S., and J.E. The CTX of these effector cells could be easily generated specifically to C.S. fibroblast as well as J.E. fibroblast targets.

In experiment 2, cryopreserved C.S. responder cells cultured with M.B. fibroblast irradiated in the presence of J.Ex lymphocytes also showed specific CTX to both M.B. fibroblast and J.E. fibroblast targets.

Although under the conditions of experiments 1 and 2, responder cells cultured with only allogeneic stimulator lymphocytes could also kill specifically target cells from donors of stimulators, in experiment 3, responder cells (M.C.) simply incubated with lymphocytes from donor J.M. with a low ratio of responder and stimulator cells like 1:0.25 showed only weak CTX to fibroblast target cells from donor J.M. When these one-way MLC were made in the presence

平均 $31.4 \pm 16.5\%$ の減弱であり、1:1 の比率による培養で得られるエフェクター細胞では10テスト中10で平均 $53.5 \pm 10.7\%$ であった。

刺激細胞として用いられる単層培養線維芽細胞に対する細胞傷害リンパ球の誘導。単層標的細胞に対する特異的細胞傷害が現在検出できるので、刺激細胞として用いる単層培養細胞に対して細胞傷害性細胞を誘導するのに必要な条件を研究した。このモデルとしては、HLA-SD表面抗原をもつことが知られている同種線維芽細胞を、細胞傷害性細胞誘導のための刺激細胞として用いた。このようにして、同種線維芽細胞を腫瘍抗原を含むSD抗原をもつ腫瘍細胞のモデルとして用いた。表5に示したように、反応細胞を線維芽細胞のみで培養した場合、芽球化又は細胞障害性細胞の発生はほとんど、あるいは全く見られなかった。細胞傷害性細胞の増殖及び誘導に必要な2シグナル刺激に関するEijssvoegelら²⁵並びにZarlingら²⁶が得た所見に基づき、第三者の刺激を加えた実験を行った。このモデルでは、M.B. 反応細胞を、リンパ球規定抗原源としてのC.Sxリンパ球とともに培養し、反応細胞の増殖を図り、J.E. 線維芽細胞上に存在するSD抗原に対して細胞傷害性細胞を誘導することを試みた(実験1)。

M.B., C.S. 及び J.E. の HLA は同一ではない。7日間の試験管内混合リンパ球培養の後、非凍結エフェクター細胞を用いて M.B., C.S. 及び J.E. から得た線維芽標的細胞について細胞性細胞傷害の検定を行った。これらのエフェクター細胞の細胞傷害は、C.S. 線維芽標的細胞及び J.E. 線維芽標的細胞に容易かつ特異的に誘導することができた。

実験2では、J.Exリンパ球の存在下で放射線を照射したM.B.線維芽細胞とともに培養したC.S.反応細胞の凍結保存細胞もまた、M.B.線維芽標的細胞及びJ.E.線維芽標的細胞に対して特異的細胞傷害を示した。

実験1及び2の条件下では、同種刺激リンパ球のみで培養した反応細胞も、刺激細胞提供者からの標的細胞を特異的に殺すことができるけれども、実験3では、反応細胞対刺激細胞が1:0.25というような低い比率でJ.M.由来リンパ球と培養した反応細胞(M.C.)は、J.M.からの線維芽標的細胞に対して弱い細胞傷害しか示さなかった。これらのone-way

TABLE 5 REPRESENTATIVE EXPERIMENTS ON GENERATING CYTOTOXIC LYMPHOCYTES
AGAINST ALLOANTIGENS ON THE SURFACE OF FIBROBLAST

表5 線維芽細胞表面上のアロ抗原に対する細胞傷害性リンパ球誘導に関する実験の代表例

Experiment No. 1

Effector Cells (250×10^3 cells/well)	$^3\text{H-TdR Uptake}$	Target Cell (1000 cells/well)		
		M.B. Fibroblast (A2, -, B7, B12, CW5)	C.S. Fibroblast (A2, A29, B12, -)	J.E. Fibroblast (A2, A10, B12, B27, CW1)
M.B. Alone	176 ± 30	2358 ± 40	1567 ± 37	1144 ± 41
M.B. + C.Sx	28978 ± 2623	1979 ± 34	168 ± 6*	798 ± 11
M.B. + J.Ex	37004 ± 2784	2188 ± 70	1182 ± 25	89 ± 7*
M.B. on C.S. Fibro ^x	1258 ± 69	2541 ± 75	1523 ± 53	1217 ± 56
M.B. + J.Ex on C.S. Fibroblast ^x	10710 ± 350	2148 ± 37	828 ± 39*	518 ± 28*
Medium Alone		2562 ± 72	1714 ± 51	1166 ± 30

Experiment No. 2

Effector Cells (250×10^3 cells/well)	$^3\text{H-TdR Uptake}$	Target Cell (1000 cells/well)		
		M.B. Fibroblast	C.S. Fibroblast	J.E. Fibroblast
C.S. Alone	233 ± 26	2306 ± 57	1412 ± 59	1228 ± 28
C.S. + M.Bx	28860 ± 1139	1081 ± 62*	1068 ± 20	867 ± 28
C.S. + J.Ex	43677 ± 1512	1704 ± 49	1042 ± 82	455 ± 13*
C.S. on M.B. Fibro ^x	998 ± 68	2610 ± 57	1411 ± 31	1325 ± 41
C.S. + J.Ex on M.B. Fibro ^x	21625 ± 1132	1330 ± 68*	1154 ± 31	560 ± 29*
Normal Lym + PHA	-	131 ± 5	87 ± 4	65 ± 2
Medium Alone	-	2795 ± 97	1524 ± 31	1250 ± 23

Experiment No. 3

Effector Cells (250×10^3 cells/well)	$^3\text{H-TdR Uptake}$	Target Cell (1000 cells/well)		
		M.C. Fibroblast (A2, A29, B12, -)	J.M. Fibroblast (A1, AW24, B8, B15)	Y.K. Fibroblast (A2, A9, B5, -, CW1)
M.C. Alone	999 ± 87	2526 ± 214	1307 ± 18	1914 ± 72
M.C. + J.Mx	45528 ± 527	2959 ± 163	1057 ± 25	2017 ± 82
M.C. + M.Cx + Y.K. Fib.	965 ± 16	2481 ± 265	1286 ± 67	1927 ± 32
M.C. + J.Mx on M.C. Fib ^x	31840 ± 3010	2206 ± 95	769 ± 29*	1689 ± 72
M.C. + J.Mx on Y.K. Fib ^x	32590 ± 38	2041 ± 126	537 ± 26*	1125 ± 83*
Normal Lym + PHA	-	1209 ± 89	429 ± 35	1034 ± 14
Medium Alone	-	3552 ± 93	1705 ± 31	2189 ± 87

Effector cells were prepared from 7-day primary in vitro sensitization. In experiment 1 effector cells were unfrozen cells, and in experiment 2 effector cells were frozen in Revco for 2 hours, then thawed. In experiment 3 effector cells were frozen in Revco overnight and then transferred into liquid nitrogen tank until use.

7日間の試験管内一次感作によって得られたエフェクター細胞を使用した。実験1では、エフェクター細胞は非凍結細胞であり、実験2では、エフェクター細胞は revco 内で2時間冷凍の後解凍したものであった。実験3では、エフェクター細胞は一晚 Revco 内で冷凍し、液体窒素タンクに移動し、使用時まで保存した。

Ratio of responder and stimulator lymphocytes in in vitro sensitization was 1:0.5 in exp. 1, 1:1 in exp. 2, 1:0.25 in exp. 3.

試験管内感作における反応リンパ球と刺激リンパ球の比率は、実験1では1:0.5、実験2では1:1、実験3では1:0.25であった。

1.68×10^6 fibroblast in the culture of in vitro sensitization were irradiated at 4500 rad. The ratio of responder cells and fibroblast was 1:0.05.

試験管内感作の培養における 1.68×10^6 の線維芽細胞には、4,500rad の放射線照射を行った。反応細胞と線維芽細胞の比率は1:0.05であった。

*See Table 2. 表2参照

of fibroblasts, effector cells M.C.+J.Mx on fibroblasts autologous to M.C. showed increased CTX to J.M. fibroblast targets keeping a specific pattern, and effector cells M.C.+J.Mx on fibroblasts (Y.K.) allogeneic to both responder and stimulator lymphocytes also showed greater CTX to both J.M. and Y.K. fibroblasts than the degree of specific CTX presented by responder cells simply incubated with lymphocytes from donor J.M.

DISCUSSION

The MLC and CMC assay has proved to be a useful model for the study of the mechanisms of activation and development and of target specificity of cytotoxic effector cells, i.e., the assay systems are extensively used for the study of alloantigens or tumor antigens and for typing transplant recipients and donors.^{1-5,24-28} However, sometimes complicated interpretations are made of these assays due to unexpected destruction of autologous or third party targets used as controls.^{13,14,29-31}

The specific studies we have attempted here were made to answer: 1) why MLC cells nonspecifically kill autologous monolayer targets, as it is unusual for target cells grown in suspension culture to be so killed, 2) whether we can differentiate specifically cytotoxic lymphocytes to monolayer target cells and under what condition of MLC we can do this, 3) whether specific cytotoxic effector cells generated in vitro can be preserved without loss of much of their reactivity, and 4) whether cytotoxic lymphocytes can be generated to HLA-SD antigens present on fibroblasts as a model for SD antigen-bearing tumor cells.

One of the problems with human tumor models has been that most human solid tumors grow as monolayer cultured cells. In contrast to suspension culture cells^{26,28} these monolayer culture cells seem to be very sensitive to detachment by nonspecific effects of lymphoblast cells induced with mitogens and antigens.^{13,17}

The results of the present study demonstrated that lymphocytes sensitized with allogeneic lymphocytes in vitro have two distinct cytotoxic activities, which are quite distinguishable by the kinetics of generation of effector cells and by the different types of destroyed target cells. As shown in Figure 3, there was a strong non-

混合リンパ球培養を、線維芽細胞の存在下で行うと、M.C. 由来線維芽細胞の存在下で培養した M.C. + J.Mx エフェクター細胞は、J.M. 線維芽標的細胞に対して、特異的細胞傷害の増加を示した。そして、反応リンパ球及び刺激リンパ球とは遺伝的に異なった線維芽細胞 (Y.K.) の存在下で培養した M.C. + J.Mx エフェクター細胞もまた、J.M. からのリンパ球で単純培養した反応細胞が示した特異的細胞傷害の程度よりも、J.M. 線維芽細胞及び Y.K. 線維芽細胞に対してより大きな細胞傷害を示した。

考 察

混合リンパ球培養試験及び細胞性細胞傷害試験は、細胞傷害性エフェクター細胞の活性及び成長の機序並びに同細胞の標的的特異性について研究する上で有益なモデルであることが分かってきている。すなわち、これらの試験系は、アロ抗原又は腫瘍抗原の研究及び移植の際の受容者・提供者の型決定に広く用いられている。^{1-5,24-28} しかしながら、対照として用いた自己標的細胞又は第三者標的細胞の予期せぬ崩壊のために、これらの試験について複雑な解釈がしばしば行われている。^{13,14,29-31}

ここで試みた特異的研究は次のような疑問に答えるために行った。1) 混合リンパ球培養細胞が自己単層標的細胞を非特異的に殺すのはなぜか。というのは浮遊培養液で培養した標的細胞がこのように殺されるのはまれなことである。2) 単層標的細胞に特異的な細胞傷害リンパ球を誘導できるかどうか、また、混合リンパ球培養の条件がどのようであればこれが可能か。3) 試験管内誘導の特異的細胞傷害エフェクター細胞を、その反応性を大きく失うことなく、保存できるかどうか。4) SD 抗原をもつ腫瘍細胞のモデルとして、線維芽細胞上に存在する HLA-SD 抗原に対して細胞傷害性リンパ球が誘導され得るかどうか。

ヒト腫瘍モデルについての問題の一つは、ほとんどのヒト固型腫瘍が単層培養細胞として成長するということであった。浮遊培養細胞^{26,28} とは対照的に、これらの単層培養細胞は、マイトジェン及び抗原によって誘発されたリンパ球細胞の非特異的影響による剥離に対して非常に感受性が高いようである。^{13,17}

本研究の結果によると、同種リンパ球で試験管内感作を受けたリンパ球は二つの明白な細胞活性をもち、この活性は、エフェクター細胞の誘導速度及び破壊された標的細胞の違いにより明白に区別できる。図3に示すように、3～6日間培養されたエフェクター

specific CTX of effector cells cultured for 3-6 days while mixed lymphocyte responses were increasing and reaching a peak. However, specific patterns appear with decreasing response of MLC, in some 7-day MLC cells and in most such cells after 7 days of culture. In addition, at the ratio of two responder cells to one stimulator cell (1:0.5) in primary MLC, less blastogenesis but many strongly reactive specific patterns of CTX are seen at even seven days after priming.

Although all of the tissue culture cells were carried in prescreened FCS, this nonspecific CTX was not the result of recognition of FCS antigens by responder cells because IVS was always performed in normal human serum.

Another possibility is that this nonselective and wide spectrum CTX may be attributable to *in vitro* augmentation of natural killer (NK) CMC.³²⁻³⁴ It is well known that NK cells are induced or activated by interferon³⁵ which may be produced in MLC. And a relation has been observed between NK cell activity and graft vs disease.³⁶ Thus, *in vitro* augmented or generated NK cells may react against some normal cells.³⁷

It is more likely that nonspecific CTX against monolayer targets is caused by lymphoblasts attacking directly or releasing lymphocyte effector molecules, which are cytotoxic to nonlymphoid cells *in vitro*.¹⁶

Several means were tried to knock out these blast cells in the effector cell suspension, but the procedures for this (adsorption of effector cells on monolayer cultured cells, irradiation, treatment of effector cells with drugs blocking cell metabolism) were not always perfect (data not shown). Subsequently, the method of cryopreservation was studied in order to determine whether known specific cytotoxic effector cells are preservable after once tested with unfrozen effector cells. It was found that such specific CTX could be cryopreserved (Table 2). In addition, interestingly enough, another experiment revealed cryopreservation to be the most effective way for reducing nonspecific CTX and enhancing specific patterns.

Our freezing rate is four times as fast as that with a rate-controlled freezer. According to the study of Knight et al,³⁸ rate-controlled slow-freezing

細胞に強い非特異的細胞傷害が見られ、その間、混合リンパ球反応が増加し、ピークに達した。しかしながら、混合リンパ球培養反応が低下を示すに従って、すなわち混合リンパ球7日間培養細胞の一部に、また、7日間培養後の同細胞のほとんどにおいて、特異的パターンが現れる。これに加えて、混合リンパ球一次培養において、反応細胞2に対して刺激細胞1の比率(1:0.5)で、芽球化は少ないが強い反応性を示す細胞傷害の特異的パターンが抗原刺激後7日目でさえ認められる。

組織培養細胞はすべて、スクリーン済みの仔牛血清で維持していたが、試験管内感作は常に正常ヒト血清で行ったので、この非特異的細胞傷害は反応細胞による仔牛血清抗原の認識の結果ではない。

もう一つの可能性としては、この非選択的で広範囲のスペクトルをもつ細胞傷害は、natural killer (NK) 細胞性細胞傷害の試験管内増加によるものであることが考えられる。³²⁻³⁴ NK細胞は、混合リンパ球培養で産生されと思われるインターフェロン³⁵によって誘発ないしは活性化されることはよく知られている。また、NK細胞活性とgraft vs diseaseの関係も認められている。³⁶ このように、試験管内で増加あるいは誘導したNK細胞は、幾つかの正常細胞に対して反応するかもしれない。³⁷

単層標的細胞に対する非特異的細胞傷害は、リンパ芽球によって直接攻撃されたり、又は試験管内で非リンパ系細胞に対して細胞傷害を示すリンパ球由来活性因子を放出するリンパ芽球によって惹起される可能性の方が強い。¹⁶

これら芽球性細胞をエフェクター細胞浮遊液の中から除去する方法を幾つか試みたが、用いられた方法(単層培養細胞上のエフェクター細胞の吸収、放射線照射、細胞代謝遮断剤によるエフェクター細胞の処理)は常に十分とは言えなかった(データは示していない)。続いて、凍結保存法について研究し、既知の特異的細胞傷害性エフェクター細胞が、一度非凍結エフェクター細胞で検査された後、保存可能か否かを調べたが、このような特異的細胞傷害性エフェクター細胞は凍結保存できることがわかった(表2)。これに加えて興味深いのは、別の実験で、非特異的細胞傷害を減弱し、特異的パターンを増強するのに、凍結保存が最も有効であることが示されたことである。

我々の用いた凍結速度は、速度調整フリーザーのその4倍である。Knightら³⁸の研究によると、速度調整による低速凍結は、芽球細胞及び活発に

is better to preserve blast cells and cells actively synthesizing DNA. The lymphoblast cells may be easily inactivated or destroyed by rapid rate freezing.

Effect of DMSO on diminishing activity of non-specific CTX may be present. But the toxicity, if any, may be little because the cells are kept at lower temperatures during the exposure period and CMC assay is usually performed for 40 hours, which is long enough to kill target cells.

Cryopreserved effector cells, while still maintaining high levels of specific CTX when they were prepared from 1:1 ratio of responder and stimulator cells in MLC, also did show reduced activity against specific target cells as compared with unfrozen cells.

However, the degrees of diminishment of percent reduction of target cells against control and specific target cells were nearly equal (against control target cells: from $46.3 \pm 26.1\%$ to $13.5 \pm 11.0\%$, against specific target cells: from $88.1 \pm 8.6\%$ to $53.5 \pm 10.7\%$).

So, when the MLC are performed under appropriate and sufficient doses of alloantigens (suitable ratio of responder and stimulator cells seems 1:1), diminishment of effector cell activity against specific target cells seems due to diminishment of the nonspecific activity, or due to both maximal diminishment of the nonspecific activity and minimal diminishment of specific activity.

Parenthetically, we compared the cytotoxic activity of T cell preparation from patients who have strong selective CTX for melanoma tumor cells and found that under these circumstances, the cryopreserved cells are as cytotoxic as the fresh cells.

It is well known that there are two distinct phases in MLC and CMC systems,^{2,5} the first T cells respond to antigens coded in HLA-D locus and the second T cells (CTL) respond to antigens closely associated with HLA-SD locus antigens, which act as the targets for the CTL. To perform studies under the conditions necessary to generate cytotoxic cells against monolayer cultured cells, we used allogeneic fibroblasts as the stimulator cells for generation of cytotoxic cells because they are known to bear HLA-SD surface alloantigens.^{39,40} Thus they serve as a

DNAを合成する細胞を保存するのに適している。リンパ芽球細胞は、高速凍凍によって容易に不活性化あるいは破壊されるようである。

非特異的細胞傷害活性の減弱に対するジメチル・スルフォキシドの影響が存在するかもしれない。しかし、その細胞傷害は、存在するとしても非常に少ないと思われる。というのは、曝露期間中細胞は低温で保存され、細胞性細胞傷害試験は通常40時間行われるが、この時間は標的細胞を殺すのに十分である。

凍結保存エフェクター細胞が混合リンパ球培養で反応細胞対刺激細胞1:1の比率で産生されたとき、高値の特異的細胞傷害を維持し続けながらも、同細胞はまた、非凍結細胞と比較して特異的標的細胞に対して活性の低下を示した。

しかしながら、対照標的細胞と特異的標的細胞に対する標的細胞の減少率の低下の程度はほぼ同じであった(対照標的細胞に対しては $46.3 \pm 26.1\%$ から $13.5 \pm 11.0\%$ 、特異的標的細胞に対しては $88.1 \pm 8.6\%$ から $53.5 \pm 10.7\%$)。

したがって、混合リンパ球培養を適当で十分な量のアロ抗原の下で行った場合(反応細胞と刺激細胞の適切な比率は、1:1のようである)、特異的標的細胞に対するエフェクター細胞活性の減弱は、非特異的活性の減弱、若しくは非特異的活性の最大減弱及び特異的活性の最少減弱の両方によるものと思われる。

更に、我々は、黒色腫瘍細胞に対して強い選択的細胞傷害をもつ患者から得たT細胞の細胞活性を比較し、これらの条件の下では、凍結保存細胞は新鮮細胞と同様に細胞傷害性があることを認めている。

混合リンパ球培養系及び細胞性細胞傷害系には二つの明白な段階があることはよく知られている。^{2,5} すなわち、最初のT細胞がHLA-D遺伝子座にコードされた抗原に反応し、2番目のT細胞(CTL)が、その標的として働くHLA-SD遺伝子座抗原と密接に関連している抗原と反応する。単層培養細胞に対して細胞傷害性細胞を誘導するのに必要な条件で研究を行うために、HLA-SD表面アロ抗原をもつことが知られている同種線維芽細胞を、細胞傷害性細胞の誘導のための刺激細胞として用いた。^{39,40} したがって、

model for SD antigen-bearing tumor cells. When we set up person A responding to fibroblast Bx, we found little or no blastogenesis or development of cytotoxic cells. This is consistent with the findings of others.^{2,27}

On the basis of the evidence of Eijssvoegel et al^{25,27} and Schendel and Bach,⁴ who showed that generation of CTL was possible even though HLA-D lymphocyte-activating determinants were not present on the same cells as HLA-A, B, or C SD antigens, Zarling et al²⁶ and Lee and Oliver²⁸ made these three-cell experiments in which remission lymphocytes of leukemia patients cultured with autologous leukemic blast cells and allogeneic lymphocytes differentiate to CTL which were cytotoxic for the autologous leukemic blast cells.

According to the above, we studied this third party experiment by using fibroblast monolayer cells. We added unrelated allogeneic lymphocytes Cx to supply HLA-D antigens to responder lymphocytes A and fibroblast Bx culture. We could quite easily generate CTL to fibroblast B under this condition.

A surprising finding was that CTX to fibroblast B or C was even greater than the amount of specific CTX we got when we simply incubated responder A with lymphocytes from donor B or C and tested on fibroblasts B or C. This finding usually occurred when responder A lymphocytes were cultured with a low dose of stimulator lymphocytes C in the presence of fibroblast B.

This suboptimal, simple MLC for generation of cytotoxic lymphocytes may require the feeder effect by adding fibroblasts or increasing the number of stimulator cells (because optimal MLC ratio like 1:1 can itself generate good CTX). Further, as described by Zarling et al,⁴¹ interferon produced by irradiated fibroblasts may augment the development of cytotoxic lymphocytes.

More studies are necessary of these points, however, all of the observations presented here are important from the point of view of generating cytotoxic lymphocytes against human tumor antigens.

同種線維芽細胞は、SD抗原をもつ腫瘍細胞のためのモデルとして働く。線維芽細胞 Bx に反応するヒト A について検査した場合、リンパ芽球の発生又は細胞傷害性細胞の出現はごくわずかか、全く認められなかった。このことは、他の研究者の報告と一致する。^{2,27}

HLA-D リンパ球活性化決定基が、HLA-A, B 又は C の SD 抗原をもつ同じ細胞上に存在しない場合でも、細胞傷害性 T リンパ球の誘導は可能であることを示した Eijssvoegel ら^{25,27} 及び Schendel と Bach⁴ の所見に基づいて、Zarling ら²⁶ 及び Lee と Oliver²⁸ は上記 3 種細胞混合実験を行った。この実験では、緩解にある白血病患者のリンパ球を自己白血病芽球細胞及び同種リンパ球とともに培養したところ、自己白血病芽球細胞に対して細胞傷害性をもつ細胞傷害性 T リンパ球へ分化した。

上記の結果に基づき、線維芽単層細胞を用いて、この 3 種細胞混合実験について研究した。反応リンパ球 A 及び線維芽細胞 Bx に HLA-D 抗原を捕うために、関連のない同種リンパ球 Cx を加えた。この状況下で、線維芽細胞 B に細胞傷害性 T リンパ球をかなり容易に誘導することができた。

この細胞傷害性に関しては、反応細胞 A を提供者 B 又は C から得たリンパ球と単純に培養させ、線維芽細胞 B 又は C 上でテストして得られた特異的細胞傷害の程度よりも、線維芽細胞 B 又は C に対する細胞傷害の方が大きいということは驚くべき所見であった。反応 A リンパ球を、線維芽細胞 B の存在下で少量の刺激リンパ球 C と培養した場合、この所見は通常認められた。

細胞傷害性リンパ球誘導のための、この亜最適単純混合リンパ球培養は、線維芽細胞を加えるか、刺激細胞の数を増加させることによる供給効果を必要とするであろう(なぜなら、1:1 というような、混合リンパ球培養の最適比自体によって良好な細胞傷害性を誘導することができるからである)。更に、Zarling ら⁴¹ が述べたように、放射線を照射した線維芽細胞により産生されたインターフェロンが細胞傷害性リンパ球の発生を増進するのかもしれない。

これらの点に関して更に研究することが必要であるが、ここに提示した観察結果はすべて、細胞傷害性リンパ球をヒト腫瘍抗原に誘導するという点から見れば重要である。

REFERENCES

参考文献

1. TRINCHIERI G, BERNOCO D, CURTONI SE, MIGGIANO VC, CEPPELLINI R: Cell-mediated lympholysis in man, relevance of HLA antigens and antibodies. In *Histocompatibility Testing*. Ed by J. Dausset and J. Colombani, Copenhagen, Munksgaard, 1972. pp. 509-19
2. EIJSVOOGEL VP, du BOIS R, MELIEF CJM, ZEYLEMAKER WP, RAAT-KONING L, deGROOT-KOOY L: Lymphocyte activation and destruction in vitro in relation to MLC and HLA. *Transplant Proc* 5:1301-7, 1973
3. ALTER BJ, SCHENDEL DJ, BACH ML, BACH FH, KLEIN J, STIMPFLING JH: Cell-mediated lympholysis: Importance of serologically defined H-2 regions. *J Exp Med* 137:1303-9, 1973
4. SCHENDEL DJ, BACH FH: Genetic control of cell-mediated lympholysis in mouse. *J Exp Med* 140:1534-46, 1974
5. BACH FH, BACH ML, SONDEL PM: Differential function of major histocompatibility complex antigens in T-lymphocyte activation. *Nature* 259:273-81, 1976
6. CEROTTINI JC, ENGERS HD, MACDONALD HR, BRUNNER KT: Generation of cytotoxic T lymphocytes in vitro. I. Response of normal and immune mouse spleen cells in mixed leukocyte culture. *J Exp Med* 140:703-17, 1974
7. ZARLING JM, McKEOUGH M, BACH FH: A sensitive micromethod for generating and assaying allogeneically induced cytotoxic human lymphocytes. *Transplantation* 21:468-76, 1976
8. WAGNER H: The correlation between the proliferation and the cytotoxic response of mouse lymphocytes to allogeneic cells in vitro. *J Immunol* 109:630-7, 1972
9. WAGNER H, FELDMANN M: Cell-mediated immune response in vitro. I. A new in vitro system for the generation of cell-mediated cytotoxic activity. *Cell Immunol* 3:405-20, 1972
10. GEHA RS, MALAKIAN A, GEHA O, YUNIS E: Genetics of cell-mediated lympholysis in man. *J Immunol* 118:1286-91, 1977
11. LONG MA, HANDWERGER BS, AMOS DB, YUNIS E: The genetics of cell-mediated lympholysis. *J Immunol* 117:2092-9, 1976
12. SENIK A, BLOOM BR: Differentiation of memory T cells to virus plaque-forming cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 146:11-21, 1977
13. COATES AS, CRAWFORD M: Cell-mediated cytotoxicity to human melanoma cell lines: Nonspecific active in vitro augmentation. *Cancer Immunol Immunother* 3:131-6, 1977
14. MARTIN-CHANDON MR, VANKEY F, CARNAUD C, KLEIN E: In vitro "education" on autologous human sarcoma generates non-specific killer cells. *Int J Cancer* 15:342-50, 1975
15. SCHECHTER B, FELDMAN M: An in vitro assay of cell-mediated cytotoxicity. Terminal labelling with ³H-leucine. *Transplantation* 22:337-44, 1976
16. HISERODT JC, PRIEUR A-M, GRANGER GA: In vitro lymphocyte cytotoxicity. I. Evidence of multiple cytotoxic molecules secreted by mitogen activated human lymphoid cells in vitro. *Cell Immunol* 24:277-88, 1976
17. BEAN MA, KODERA Y, AKIYAMA M: Microcytotoxicity test results with human cells. Why the controversy? *Isr J Med Sci* 14:162-76, 1978

18. HERR HW, BEAN MA, WHITMORE WF Jr.: Decreased ability of blood leukocytes from patients with tumors of the urinary bladder to act as stimulator cells in mixed leukocyte culture. *Cancer Res* 36:2754-60, 1976
19. MILLER RA, BEAN MA, KODERA Y, HERR HW: Cryopreservation of human effector cells active in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Transplantation* 21:517-9, 1976
20. BEAN MA, PEES H, ROSEN G, OETTGEN HF: Prelabelling target cells with ³H-proline as a method for studying lymphocyte cytotoxicity. *Natl Cancer Inst Monogr* 37:41-8, 1973
21. BEAN MA, PEES H, FOGH JE, GRABSTALD H, OETTGEN HF: Cytotoxicity of lymphocytes from patients with cancer of the urinary bladder: Detection by ³H-proline microcytotoxicity test. *Int J Cancer* 14:186-97, 1974
22. KODERA Y, BEAN MA: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity for human monolayer target cells bearing blood group and transplantation antigens and for melanoma cells. *Int J Cancer* 16:579-92, 1975
23. BEAN MA, KODERA Y, SHIKU H: Tritiated-proline microcytotoxicity assay for the study of cellular and humoral immune reactions directed against target cells grown in monolayer culture. In *In Vitro Methods in Cell-mediated and Tumor Immunity*. Ed by Bloom BR and David JR. New York, Academic Press, 1976. pp. 471-80
24. SHIKU H, BEAN MA, OLD LJ, OETTGEN HF: Cytotoxic reactions of murine lymphoid cells studied with a tritiated proline microcytotoxicity test. *J Natl Cancer Inst* 54:415-25, 1975
25. EIJSVOOGEL VP, du BOIS MJ, MEINESZ A, BIERHORSH-EIJLANDER A, ZEYLEMAKER WP, SCHELLEKEN PT: The specificity and activation mechanism of CML in man. *Transplant Proc* 5:1675-8, 1973
26. ZARLING JM, RAICH PC, McKEOUGH M, BACH FH: Generation of cytotoxic lymphocytes in vitro against autologous human leukemia cells. *Nature* 262:691-3, 1976
27. EIJSVOOGEL VP, SCHELLEKENS PT, du BOIS MJ, ZEYLEMAKER WP: Human cytotoxic lymphocytes after alloimmunization in vitro. *Transplant Rev* 29:125-45, 1976
28. LEE SK, OLIVER RTD: Autologous leukemia-specific T-cell mediated lymphocytotoxicity in patients with acute myelogenous leukemia. *J Exp Med* 147:912-22, 1978
29. KRISTENSEN T, GRUNNET N, KISSMEYER-NIELSEN F: Cell-mediated lympholysis in man. Occurrence of unexpected HL-A (LA and Four) irrelevant lympholysis. *Tissue Antigens* 4:378-82, 1974
30. BUTTERWORTH AE, FRANKS D: Nonspecific cytotoxic effects of antigen-transformed lymphocytes. III. Relationship to specific cytotoxicity. *Cell Immunol* 16:74-81, 1975
31. TAKASUGI M, MICKEY MR: Interaction analysis of selective and nonselective cell-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 57:225-61, 1976
32. SEELEY JK, GOLUB SH: Studies on cytotoxicity generated in human mixed lymphocyte cultures. I. Time course and target spectrum of several distinct concomitant cytotoxic activities. *J Immunol* 120:1415-22, 1978
33. ZARLING JM, KUNG PC: Monoclonal antibodies which distinguish between human NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 288:394-6, 1980
34. SEELEY JK, MASUCCI G, POROS A, KLEIN E, GOLUB SH: Studies on cytotoxicity generated in human mixed lymphocyte cultures. II. Anti-K562 effectors are distinct from allospecific CTL and can be generated from NK-depleted T cells. *J Immunol* 123:1303-11, 1979

35. HERBERMAN RB, ORTALDO JR, BONNARD GD: Augmentations by interferon of human natural and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Nature* 277:221-3, 1979
36. LOPEZ C, KIRKPATRICK D, SORELL M, O'REILLY RV, CHING C: Association between pre-transplant natural killer and graft versus host disease after stem-cell transplantation. *Lancet* 2:1103-6, 1979
37. HERBERMAN RB, ORTALDO JR: Natural killer cells: Their role in defense against disease. *Science* 214:24-30, 1981
38. KNIGHT SC, FARRANT J, MORRIS GJ: Separation of population of lymphocytes by freezing and thawing. *Nature (New Biol)* 239:88-89, 1972
39. THORSBY E, LIE S: Antigen on human fibroblasts demonstrated with HL-A antisera and anti-human lymphocyte sera. *Vox Sang* 15:44-53, 1968
40. BRAUTBAR C, STANBRIDGE EJ, PELLEGRINO MA, FERRONE S, REISFELD RA, PAYNE R, HAYFLICK L: Expression of HL-A antigens on cultured human fibroblasts infected with mycoplasma. *J Immunol* 111:1783-9, 1973
41. ZARLING J, SOSMAN J, BORDEN E, CARTER W, HOROSZEWICS J: Enhance of allogeneically induced cytotoxic lymphocyte responses by purified human fibroblast interferon. *Proc Am Assoc Cancer Res* 19:108, 1978