

LAK 細胞の血管内皮細胞下への遊走能

— In Vitro 測定系を用いた検討 —

北山 丈二

## LAK 細胞の血管内皮細胞下への遊走能

## — In Vitro 測定系を用いた検討 —

北 山 丈 二

## はじめに

外科的根治が困難な進行癌症例に対する補助療法あるいは集学的治療の一環として、様々な免疫療法が模索されている。しかし、その臨床治療成績は個々の報告により多種多様であり、普遍性のある有効な治療法はいまだ見いだされていない。LAK療法に代表される養子免疫療法も、1985年、Rosenbergらの報告<sup>1)</sup>以来いくつかの臨床応用が試みられたが、その成績は動物を用いた当初の基礎実験結果に反して、malignant melanoma、renal cell carcinomaを除くと、有効例は少なく、特に消化器癌に対してはほとんどが無効であるという結果に終わった<sup>2-3)</sup>。その主な原因としては、(1)LAK細胞が自己腫瘍に対する特異性を有していないこと、(2)通常の全身投与では、充分量のLAK細胞を腫瘍組織内に浸潤させることが困難であることの二点が指摘されている。

(1)の観点からは、その後、TIL (tumor-infiltrating lymphocytes) やin vitroで自己腫瘍細胞に感作させたCTL (cytotoxic T cell)などの活性化T細胞が、より自己腫瘍に特異性を有する細胞として注目され、これらを用いた新しい養子免疫療法に関する研究が精力的に行なわれた<sup>4-7)</sup>。しかし、これらの活性化T細胞を用いた養子免疫療法の効果は腫瘍の免疫原性に強く依存してお

り、本来免疫原性の乏しい消化器癌などに対しては満足すべき成果は得られず、近年はむしろ、特異性には欠けるが広汎な細胞障害活性をもつLAK細胞の有用性が再評価されつつある。

(2)については、Isotopeを用いた検討により、LAK細胞は末梢静脈内に投与すると、数時間は肺に留まった後、ほとんどは肝臓、脾臓に移行し、腫瘍局所に集積する細胞は極めて少ないことが古くから指摘されており<sup>9-11)</sup>、これがLAK細胞のIn vivoでの抗腫瘍効果を制限している重大な要因ではないかと推測されてきた。これに対し、TILやある種のCTLは腫瘍部への選択的な集積傾向があるとされているが、これを示唆する報告<sup>10-11)</sup>を参照すると、これらのT細胞が健常部に比して腫瘍部で高率に検出されるという事実は認められるものの、腫瘍組織内の細胞量は投与した総細胞量と比較するとやはり極めて少数に留まっている事が示されている。したがって、LAK細胞に代表されるエフェクター細胞の腫瘍組織へのTargetingは養子免疫療法の臨床応用上、重要な課題であるにもかかわらず、血管内投与された細胞がどの程度生体組織内への浸潤能を有し、それがどの程度腫瘍選択的であるのか、またいかなる機序で制御されているのか、などの点についての知見は現時点ではほとんど得られていない。

一般に末梢血リンパ球(PBL)は、リンパ組織や炎症巣において

血管内皮細胞層を通過し組織内に浸潤する。この組織浸潤の最初のステップは特殊に分化した血管内皮細胞への接着であり、これには様々な接着分子(adhesion molecules)が関与している事が解明されてきた<sup>12-13)</sup>。さらに、内皮細胞に接着したリンパ球の一部は内皮細胞間を通過、内皮下に遊走し、組織内に浸潤するが、この過程にはさらに異なる接着分子が関与しており、それらの接着分子はお互いに密接な関連のもとに機能している事も明かとなってきた(接着分子のクロストーク)<sup>14-18)</sup>。したがって、接着分子を介したLAK細胞と内皮細胞とのinteractionは、LAKの Targetingを考える上で重要な意義をもつと考えられる。

さて、接着分子は細胞と細胞、および細胞と細胞外マトリックスとの単なる機械的接着ばかりではなく、細胞内外の情報伝達や形態変化に密接に関与しており<sup>19-20)</sup>、その機能は様々なサイトカイン等によって制御されていることも明かとなってきた。一般にリンパ球においては、活性化シグナルにより膜上の接着分子は機能的に活性化され、様々な免疫反応に促進的に作用することが知られている<sup>19, 21)</sup>。Interleukin-2で活性化されたLAK細胞も非刺激PBLに比べ、膜上の接着分子( $\beta 1, \beta 2$  Integrin, CD44)の発現および機能が増強する事が既に認められており<sup>19, 22)</sup>、これがLAK細胞の腫瘍細胞障害活性と深く関係していると考えられている。

しかし、LAK細胞上のこれらの接着分子が内皮細胞との interactionにおいてどのように機能しているかについては現在まで詳細な検討はなされていない。そこで以下の事を目的とした研究を企画した。



## 研究目的

エフェクター細胞の腫瘍組織への集積率の向上はその治療効果の向上にとって必須の条件であることは言うまでもない。したがって、エフェクター細胞を効率よく腫瘍組織内へ浸潤させる細胞投与方法を確立することは、今後の癌養子免疫療法の発展上重要な課題の一つであると思われる。そこでLAK細胞のTargetingと深い関わりをもつと考えられるLAKと血管内皮細胞とのinteractionに基礎的検討を加えることを本研究の目的とした。

具体的には、コラーゲンゲルとヒト臍帯由来内皮細胞 (HUVEC) を用いたIn Vitroにおけるリンパ球の内皮細胞下への遊走能の定量する測定系を新たに作成し、この系と従来の内皮細胞への接着能の測定系とを用いて、LAK細胞がどの程度の内皮細胞接着能、および内皮細胞下遊走能を有しているのかをまず最初に検討することにした。しかし、内皮下への遊走実験は、短時間の接着実験とは異なり数時間を要するため、通常の方法では、HUVECがLAK細胞によって障害され、遊走を検討するには適さないことが明らかとなった。そこで、まず異なった細胞数比において、LAKによるHUVECの細胞障害活性を測定し、LAK細胞の障害活性の影響しない条件を設定した後、この条件下で遊走現象を検討することにした。

一般に白血球は正常内皮に対してはわずかな接着、遊走を示す

のみであるが、内皮細胞は $\text{rIL1-}\beta$ ,  $\text{rTNF-}\alpha$ ,  $\text{rIFN-}\gamma$ 等の炎症性刺激によって $\text{ICAM-1}$ ,  $\text{ELAM-1}$ ,  $\text{VCAM-1}$ などの接着分子を膜上に発現し、それを介して白血球上の接着分子と結合、その組織浸潤を誘導する事が知られている。そこで、次にLAK細胞が炎症巣においてどの程度の接着能、遊走能の変化を示すかを明らかにするために、血管壁モデル上のHUVECをあらかじめこれらの炎症性サイトカインで前処置し、LAK細胞の接着、遊走率がどの程度変化するかをPBLと比較検討した。

さらに、リンパ球及び血管内皮細胞上の代表的な接着分子に対するモノクローナル抗体を用いた抑制実験を施行し、LAK細胞の内皮への接着、遊走現象にどの接着分子がどの程度関与しているかを明らかにする事を第三の目的とした。

ところで、LAKはいくつかの異なったPhenotypeのリンパ球から構成されたHeterogenousな細胞集団であり、それぞれのPhenotypeによって抗腫瘍活性に若干の違いがある事が知られている。そこで、最後にLAKのPhenotypeの間で内皮細胞への接着、遊走能に差があるかどうかを明らかにすることを目的とし、遊走実験の後、内皮下に遊走した細胞(遊走群)と、内皮に接着し下層に遊走していない細胞(接着群)に分離し、各群内でのLAK細胞の表面マーカーを実験前の細胞群と比較検討することを試みた。



## 研究材料および方法

### 1. 使用した Medium, Cytokine, monoclonal 抗体

RPMI1640, Phosphate buffered Saline (PBS), 0.25% Trypsin+ EDTAはGIBCO社より、MCDB151, Heparin, Bovine Serum Albumin (BSA)はSIGMA社より購入した。Fetal Calf Serum (FCS), Acidic Fibroblast Growth Growth Factor ( $\alpha$ -FGF), FibronectinはそれぞれHyclone社、生化学工業、和光純薬より購入した。また Migration Assay用 Type I Collagenは新田ゼラチン社の製品を用いた。Recombinant Interleukin-2 (rIL-2)は塩野義製薬から供与、recombinant-Interleukin  $1\beta$  (rIL- $1\beta$ ), recombinant-Tumor necrosis factor  $\alpha$  (rTNF- $\alpha$ ), recombinant Interferon  $\gamma$  (rIFN- $\gamma$ )はすべてGenzyme社の製品を用いた。抗体については anti-CD11a (TS1/22, IgG1), anti-CD18 (TS1/18, IgG1), anti-CD45 (4B4, IgG1)は、Hybridoma (American Type of Culture collectionより購入)の培養上清を用いた。anti-VLA4 (HP2/1, CD49d, IgG1), anti-CD44 (J-173, IgG1)はImmunotech社、anti-CD44 (A3D8, IgG1)はOncogene Science社より購入した製品を用いた。Anti-ICAM1, anti-VCAM1 (共に IgG1)は British Biotechnology社の製品を用いた。リンパ球 subsetの検討に用いた抗CD4, CD8, CD16, CD56抗体は Bec-

ton-Dickinson社の製品（それぞれ、Leu3a, Leu2b, Leu11a, Leu19）

を用いた。

## 2. LAK細胞及び血管内皮細胞の採取と培養法

血管内皮細胞（Human umbilical vein derived endothelial cell, 以下HUVEC）は今村らの方法<sup>23)</sup>に従って、ヒト臍帯より採取した。すなわち、臍帯静脈にcanulationし内腔を0.125% Trypsin + 0.01% EDTAにて還流、剥離した内皮細胞を洗浄後、2 ng/ml a-FGFおよび5  $\mu$ g/ml細胞培養用Heparinを加えた15% FCS+MCDB151培地にて培養、4-10代継代したものをを用いた。また培養容器はブタ Fibronectinをコートしたものを用い、細胞の剥離には0.25% Trypsin+0.02% EDTAを用いた。

LAK細胞は健常ヒト末梢血単核球をFicoll-Hypaque液（Pharmacia）にて遠心分離した後、Nylon wool columnを通してT細胞に分離、これを1000 U/mlのr-IL2を加えた10% FCS+RPMI1640培地で数時間から数日培養したものをを使用した。

## 3. LAK細胞による内皮細胞障害性の検討

内皮細胞（HUVEC）、ヒト末梢血単核球（PBMC）各 $1 \times 10^6$ 個を0.1 mlの10% FCS+RPMI1640に浮遊、それぞれに0.1 mlの $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ （Amer-

sham Japan)を加え、20分インキュベート、4°CのPBSにて三回洗浄後、 $5 \times 10^3$ 個ずつ96wellのU底plate (Coster)に入れて、標的細胞とした。これにLAK細胞をEffector細胞として、LAK:HUVEC=10:1ないし1:1の比率で加え、4時間後 $^{51}\text{Cr}$ の上清へのreleaseをGamma-Counterにて測定、細胞障害率の指標とした。すべての実験にて、 $^{51}\text{Cr}$ のspontaneous releaseはmaximum releaseの15%以下であった。

#### 4. LAK細胞の血管内皮細胞接着能の測定 (Adhesion Assay)

過去の報告<sup>12-14, 16-17)</sup>に準じて行なった。すなわち $1.5 \times 10^4$ 個のHUVECを96穴 Gelatin Coated Plate (Coster)に培養、Confluentに達した後、0.1% BSA+RPMI1640 Medium (Assay Medium)に浮遊させた $1 \times 10^5$ 個の蛍光標識LAK細胞を静かに重層、Plateを50G x 5minで遠心した。次いで、各WellをAssay Mediumで満たし、ナイロンテープにてsealし、上下を反転して30分間37°Cに静置、剝離したのを吸引除去した後、wellの底に残存した細胞数を蛍光量にて測定、positive control(反転せずに同時間静置したもの)とBackgroundとの比で接着率を算定した。蛍光標識は、Bluingの方法<sup>24)</sup>に従い、 $1 \times 10^5$ 個のPBL及びLAK細胞を $10 \mu\text{g/ml}$ のCarboxyl Fluorescein Di-Acetate (C-FDA, Carbiochem社)溶液に浮遊、15

分間インキュベートする方法を用いた。また、蛍光量の測定には HLA-Typing用 Microfluorometer (Leitz社)を用い、接着率を以下の数式にて算定した。

蛍光量 (Experimental well) - Background

$$\text{接着率} = \frac{\text{蛍光量 (Experimental well) - Background}}{\text{蛍光量 (Positive control well) - Background}} \times 100$$

蛍光量 (Positive control well) - Background

#### 5. LAK細胞の血管内皮細胞下浸潤能の測定 (Migration Assay)

Masuyama<sup>25)</sup>, Huber<sup>26)</sup>らの方法に準じて行なった (Figure-1)。

まず 4°Cにて Type I ウシコラーゲンゲル溶液を作成、96 wellの plateに 50  $\mu$ l ずつ分注し、37°Cにて 30-60分静置、完全にゲル化した後、 $2 \times 10^4$ 個の HUVECをその上に培養、2-3日後 confluentになったのを顕微鏡下で確認した後、血管壁のモデルとして用いた。

この血管壁モデル上に Assay Mediumに浮遊させた  $1 \times 10^4$ 個の LAK細胞を HUVECの上に静かに重層、接着実験と同様の方法で 50Gx10分遠心、37°Cの Mediumで満たし、シールし、反転した後、37°Cにて 1-6時間インキュベートした。次いで各 wellを 4°Cの PBSにて数回洗浄した。この操作によって、すべての非接着 LAK細胞、及び内皮に接着しているが内皮下に遊走していない LAK細胞の大部分は洗い流された。また HUVECの形態は若干変化した。内皮シート

とその下層のコラーゲンゲルとの接着は保たれており、この状態で内皮下のコラーゲンゲル内に遊走した細胞が最も鮮明に認知できた。この時点で内皮シートの下層に位置する細胞数を顕微鏡下に数えて遊走率を算出した。すなわち、倒立顕微鏡下任意の3視野で焦点をまずHUVECのmonolayerに焦点を合わせ、次第に下層に移動しつつ、焦点のあった細胞を1個ずつ同定、その数を数えた。Positive ControlにはHUVECを1% Paraform Aldehyde(PFA)で固定した上に同数のLAK細胞を重層、各視野におけるLAK細胞の総数を数えその平均値をとった。

#### 6. サイトカインによる内皮細胞の活性化とそれに伴う接着、遊走率の変化の検討

Wellに培養したHUVEC上に、各濃度の $\text{rIL-1}\beta$  (10-1000u/ml),  $\text{rTNF-}\alpha$  (1-100u/ml)、及び $\text{rIFN-}\gamma$  (10-1000u/ml)を加え、その存在下にさらに24時間培養、Assay Mediumにて洗浄した後、この上にPBLおよびLAKを重層、4.-5.に記載した方法で接着率、遊走率を測定し、サイトカイン非存在下のものと比較検討し、至適濃度を設定し、以降はこの濃度のサイトカインの存在下で培養したHUVECを用いて接着、遊走実験を行った。

## 7. 抗接着分子抗体を用いた抑制実験

リンパ球側の接着分子に対する抗体、抗LFA-1抗体(anti-CD11a, TS1/22 及び anti-CD18, TS1/18), 抗VLA-4抗体(anti-CD49d, HP2/1)および抗CD44抗体(A3D8, J173)は、測定前にあらかじめ被検リンパ球と混合し、室温にて30分インキュベーションした後、接着、遊走実験を行い、その値の変化を検討した。また内皮細胞側の接着分子に対する抗体(anti-ICAM-1, anti-VCAM-1)については、60分間 HUVECを前処置した後、洗浄せず測定系に存在させたままで実験を施行した。モノクローナル抗体の濃度については、抗CD11a, CD18, およびCD45抗体は培養上清の2, 4, 8, 16倍に希釈した濃度、他の抗体は、1, 5, 10, 20, 40  $\mu$ g/mlの濃度で前処置したPBLを用いた接着実験を施行し、それぞれの抗体につき抑制率が最大となる抗体濃度を検定し、以降はその濃度にて接着および遊走実験を施行した。

## 8. 接着、遊走群におけるLAK細胞のSubsetの同定

2mlのコラーゲンゲルを直径60mmのDish上で作成、 $1 \times 10^6$ 個のHUVECをその上に培養、2-3日後confluentに達した後、 $1 \times 10^6$ 個のLAK細胞を重層し、5.と同じ要領で6時間のMigration Assayを施行し、非接着LAK細胞を吸引で除去したのち、HUVEC表面を0.25%



Trypsin+ 0.02% EDTAで静かに洗浄した。この操作を数回繰り返し、HUVECに接着したまま下層まで遊走していないLAK細胞（接着群，Ad）をHUVECと共に回収した。顕微鏡下にすべてのHUVECがゲルから剥離したのを確認した後、1mg/mlのType I Collagenase(Worthington社)をゲルに加え、攪拌、ゲルを壊した後、37°Cで15分インキュベートしゲルを溶解、洗浄にてHUVEC下層のゲル内に遊走したLAK細胞を回収し遊走群，Migとした。以上二群と実験前のLAK細胞(Pre.)とをリンパ球表面マーカー；CD4，CD8，CD16，CD56、及びCD45に対するモノクローナル抗体にて染色、FACStarにてその陽性比率を測定し、それぞれのPhenotypeのCD45(+)細胞に対する相対的比率を算定した。

#### 9. 統計処理

すべてのDATAはMean±SDで表わした。有意差はTwo-tailed Student t test および分散分析にて検討した。

## 結果

### 1. Migration Assay後の血管壁モデルの肉眼的観察とLAK細胞の内皮細胞障害性

Table-1に示す通り、Effector/Target比が10:1においてHUVECはLAKによって強く障害されたが、1:1においては4時間-12時間の間で有意な $^{51}\text{Cr}$ のreleaseは検出されなかった。

実際に、HUVECの10-20倍の数のLAK細胞を加えて遊走実験を施行し、顕微鏡下に観察すると、HUVECのmonolayerが完全に破壊されているのが観察されたのに対し、HUVECと同数のLAK細胞を加えた時には、6時間インキュベートし内皮下への遊走が十分観察されるようになった時点でも、内皮シートの破壊及び内皮細胞間隙の形態的变化は全く認められなかった(Figure-2)。したがって以下の遊走実験は、LAKによる内皮細胞障害のないLAK:HUVECの細胞比1.0以下の条件で施行することとした。

### 2. 正常内皮細胞に対するLAK細胞の接着、遊走能

健康人PBLを1000u/mlのrIL-2存在下に刺激、培養したLAK細胞は、Table-2及びFigure-3に示すように、PBLに比べHUVECに強く接着するだけでなく、明らかに強い内皮下遊走能を示した。同

時に HUVEC のない状態の plate への接着、及び collagen gel への遊走を検討したが、ともに LAK は PBL よりも明らかに高値を示した。

また、この接着能、遊走能の変化はきわめて迅速で、1時間の rIL-2 の添加によっても既に有意に増強したが、7日間の培養にて接着能、遊走能ともにほぼプラトーに達し、それ以上の培養は両者ともに有意な変化をもたらさなかった。さらに、培養による遊走率の増加(0.6%から最大14.7%)は、接着率の増加(15.8%から最大で76.7%)に比して明らかに大きかった (Table-2)。また遊走率の時間的推移を検討すると、LAKの遊走はPBLと比べきわめて早期より開始し、6時間にてほぼプラトーに達した (Figure-3)。そこで以降の実験では、rIL-2にて7日間培養したLAK細胞を用い、6時間のインキュベーションにて遊走能の検討を行なった。

### 3. 血管内皮細胞の活性化に伴うLAK細胞の接着、遊走能の変化

HUVECを10u/ml-1000u/mlのrIL1- $\beta$ , rIFN- $\gamma$ 及び1u/ml-100u/mlのrTNF- $\alpha$ で24時間前処置し、洗浄した後、PBLの接着率を測定すると、rIL1- $\beta$ , rTNF- $\alpha$ , rIFN- $\gamma$ はそれぞれ100u/ml、5u/ml、250u/mlで最も顕著な変化を示し (Figure 4-A)、以降の実験はこの濃度で実験を行なった。その結果、HUVECを至適濃度の各サイトカインで24時間の前処置すると、培養前のPBLの接着はそれぞれ明

かな増加を示したのに対し ( $12.5 \pm 1.1\%$  vs  $r\text{-IL1}\beta$ ;  $30.8 \pm 1.5\%$ ,  $r\text{-TNF}\alpha$ ;  $28.9 \pm 2.0\%$ ,  $r\text{-IFN}\gamma$ ;  $31.3 \pm 2.4\%$ ,  $P < 0.02$ )、未処理の HUVEC に対してもきわめて高い接着能を示す LAK 細胞は HUVEC のサイトカイン処理により軽度の接着増強を示したものの、統計学的に有意な変化には至らなかった (Figure 4-B)。

同様の方法で内皮下への遊走能の変化を検討すると、 $r\text{IL1-}\beta$ ,  $r\text{TNF-}\alpha$ ,  $r\text{IFN-}\gamma$  で前処理された HUVEC に対する PBL の遊走率は未処理の HUVEC に対する遊走率と比べ、いずれの場合も 5-8 倍の増加を示した。これに対し、LAK 細胞の遊走率も HUVEC の活性化によって、それぞれ 1.3-1.5 倍の増加を示したが、その変化率は PBL に比べ明らかに軽度であった (Figure 4-C)。

#### 4. LAK 細胞の内皮細胞への接着に関与する接着分子の検討

まず予備実験として、それぞれの抗体を濃度別に加え PBL の HUVEC への接着率の変化を検討すると、TS1/22 及び TS1/18 (ともに抗 LFA-1 抗体) では  $1/8-1/4$  希釈で、HP2/1 (抗 VLA-4 抗体)、抗 ICAM-1 抗体、抗 VCAM-1 抗体は  $5-20 \mu\text{g/ml}$  で最大抑制効果を示した (Figure 5-A)。したがって以降の実験は、TS1/22, TS1/18 および 4B2 (抗 CD45 抗体) については上清の 4 倍と 8 倍希釈、HP2/1、抗 ICAM-1 抗体、抗 VCAM-1 抗体は  $5-20 \mu\text{g/ml}$  の濃度で施行し、その中で最大抑制効

果を示す値を採用した。なお J173、A3D8 はそれぞれ 10, 40  $\mu$ g/ml  
での値を採用した。

さて、LAK細胞を至適濃度の抗 LFA-1 抗体で前処置すると、Figure 5-B に示すようにその接着能はおおむね 20-25% 抑制された  
(抗 CD11a:  $21.4 \pm 2.7\%$ , 抗 CD18:  $22.8 \pm 5.8\%$ ,  $n=4$ )。しかしより高  
濃度の抗体を用いても抑制率に有意な増加は認められなかった。

また内皮細胞を抗 ICAM-1 に対する抗体で処理すると LAK細胞の接  
着は軽度抑制された ( $10.9 \pm 4.2$ ,  $n=3$ )。これに対し PBL の HUVEC へ  
の接着は抗 LFA-1 抗体、抗 ICAM-1 抗体によって、それぞれ 55%、46  
%抑制された。したがって LAK細胞と HUVEC の接着における LFA-1-  
ICAM-1 経路の関与する割合は、PBL と HUVEC の接着における同経路  
の関与に比べ明らかに小さいと判断された。

同様の方法で VLA-4-VCAM-1 経路の関与を検討した。PBL と HUVEC  
との接着を抑制する条件下で、抗 VLA-4 抗体は LAK-HUVEC の接着を  
ほとんど抑制しなかった。ところが、抗 LFA-1 抗体 (抗 CD11a) の  
存在下で抗 VLA-4 抗体を作用させると、抗 LFA-1 抗体単独処理時に  
比べ、軽度の接着抑制の増強が認められた ( $28.9 \pm 3.9\%$ ,  $n=4$ ,  $P <$   
 $0.05$ )。しかしこの二種の抗体の共存下でも、LAK細胞は PBL に比  
べ明らかに強い内皮への接着能を示した。

次に、リンパ球と内皮細胞の接着に関わる接着分子として知ら

れているCD44の関与について、二種の抗CD44抗体、A3D8、J173を用いた抑制実験によって検討した。しかしながら、これらの抗体は10-40  $\mu$ g/mlの濃度で使用しても、LAK細胞のみならずPBLの内皮への接着を全く抑制しなかった(Figure 5-C)。

#### 5. LAK細胞の内皮下遊走に関与する接着分子の検討

接着能の結果とは対照的に、LAK細胞の非刺激HUVEC下層への遊走は二種の抗LFA-1抗体によって強く抑制され(抗CD11a;  $75.8 \pm 6.9\%$ , 抗CD18;  $77.9 \pm 8.8\%$ ,  $n=3$ )、抗ICAM-1抗体によっても比較的強い抑制が認められた( $51.7 \pm 12.6\%$ ,  $n=3$ )。しかし、抗VLA-4抗体、抗VCAM-1抗体は単独で使用した時も、抗LFA-1抗体と併用した時も、ともに明らかな抑制効果ないし抑制率の増大を示さなかった(Figure 6-A)。同様に抗CD44抗体もLAKの遊走に対し有意な影響は及ぼさなかった(Figure 6-B)。

さらにrIL1- $\beta$ 、及びrIFN- $\gamma$ で刺激したHUVECに対する遊走がこれらの接着分子抗体でどの程度抑制されるかを検討したが、Figure 6-Aに示す如く、非刺激HUVECに対するものと同様に抗LFA-1抗体、抗ICAM-1抗体によって強く抑制され、この抗体存在下の遊走率は未処理のHUVECに対する遊走率とほぼ同じレベルまで低下した。



## 6. LAK細胞の Phenotypeと内皮への接着、内皮下遊走能との関連

Table-3に示すように、CD4(+)T-LAKの割合は実験前( $32.5 \pm 17.5\%$ )と比して、接着群( $22.5 \pm 10.8\%$ )、遊走群( $15.5 \pm 7.6\%$ )で明らかに低下していた ( $P < 0.05$ )。一方、CD8(+)T-LAKの割合は実験前の値( $39.3 \pm 5.1$ )と比べ接着群( $44.5 \pm 3.9\%$ )、遊走群( $55.2 \pm 7.2\%$ )で有意に増加していた。CD16(+)ないしCD3(-)CD56(+)をマーカーとする Natural killer phenotypeをもったNK-LAKの割合は実験前(CD16(+);  $7.5 \pm 2.3\%$ , CD3(-)CD56(+);  $8.3 \pm 2.7\%$ )に比べ、接着群(順に  $13.4 \pm 4.7\%$ ,  $14.6 \pm 5.1\%$ )では増加していたが、遊走群(順に  $2.8 \pm 1.6\%$ ,  $4.1 \pm 1.0\%$ )では逆に有意に低下していた。なお、本実験において、接着群、遊走群に属する細胞数は共に添加した総細胞数の約20%程度であった。

## 7. 内皮の活性化に伴うCD16(+)NK-LAKの遊走能の変化

HUVECを至適濃度のrIFN- $\gamma$ で24時間活性化すると、接着群、遊走群を構成するLAK細胞のPhenotypeに若干の変化が生じた。すなわちrIFN- $\gamma$ 処置後のHUVEC下への遊走群におけるCD16(+)NK-LAKの占める割合をみると、非処理のHUVECを対象とした場合に比べ有意な増加を示した ( $21.6 \pm 11.0\%$ ,  $5.0 \pm 3.0\%$ ,  $n=4$ ,  $P < 0.05$ )。逆に接着群中のCD16(+)細胞の割合はrIFN- $\gamma$ 処置によってむしろ低下傾向を示した (Table-4)。

## 考察

### 1. 測定系の妥当性について

白血球の内皮下遊走現象(transendothelial migration)を対象とするIn Vitroの研究には、Collagen Gelの他に、nitrocellulose Filter<sup>15-16)</sup>、protein coated glass<sup>17-18)</sup>や羊膜由来の結合織から構成されたchamber<sup>27-28)</sup>などを用いた様々なassay系が用いられている。しかし、Huberらの報告<sup>26)</sup>によると、内皮細胞をType I Collagen gel上で培養し、細胞間隙を顕微鏡的に観察すると、In Vivoの毛細血管内皮細胞間と同じ形態学的接着構造が存在することが確認されているため、本研究でもこの方法を採用することにした。実際にこのGel上でHUVECを培養すると、接着実験に用いたPlate上で培養した時と全く同じ形態を示し、両Assay系における内皮細胞上の接着分子(ICAM-1, ELAM-1, VCAM-1)の発現には明かな差はないことも確認できた。

この血管壁モデル上にLAK細胞を加え、一定時間インキュベートした後、LAK細胞を血管内皮細胞シートとの位置関係でみると、(1)内皮に非接着、剝離した細胞、(2)内皮の表面に接着したまま移動しない細胞、(3)内皮細胞間に存在する細胞、(4)内皮細胞下のゲル内に遊走した細胞、以上4群に分類される。本研究では、顕微鏡下で内皮細胞シート下に位置する細胞を個々に同定する方

法を採用し、(4)に相当する細胞を遊走と定義し、(3)については非遊走細胞に含めた。

この実験系で遊走能を検討する際の最大の問題点は LAK細胞による内皮細胞障害であった。事実、この血管壁モデルに HUVECの10-20倍のLAK細胞を添加し、一定時間内皮とインキュベートすると内皮細胞シートの破壊が認められ、内皮下への遊走を検討するには適さないことが明かとなった。本研究に使用した LAK細胞とHUVECはallogenicの関係にあるが、autologousの関係であっても内皮は同様に障害された<sup>29)</sup>。この現象は過去に既に報告されており、それ自体 LAK療法における最も重大な副作用とされているVascular leak syndromeの誘引となると考えられているが<sup>30-32)</sup>、本研究においては、この内皮の障害を避けるため、HUVECに比し、少ない数のLAK細胞を加えて実験を行なった。この比率(LAK:HUVEC<1:1)では、<sup>51</sup>Crのreleaseでとらえられる内皮の障害はほとんど無視できる程度であり、6時間インキュベーションの後も、個々の内皮細胞には形態学的変化は認められず、内皮細胞間の連続性も保たれていた。

しかし顕微鏡観察や<sup>51</sup>Cr release Assayでは検出できない微少な内皮細胞障害が存在し、これが LAK細胞の遊走を促進している可能性は依然否定できないと思われた。しかし rIFN- $\gamma$ で処理した

HUVECはLAK細胞の細胞障害性に対しより耐性であるが<sup>21)</sup>、その下層への遊走率は非処理のHUVECに対する値より高いこと、CD16(+)NK-LAKはHUVECに対し最も強い障害能を有してていたが<sup>29)</sup>、その遊走能はむしろ乏しいことなどの事実から考えると、その可能性は否定的であった。したがって、本実験で得られたLAK細胞の内皮下遊走能には内皮障害は直接関与していないと考えられた。しかし、本実験系はアロの細胞間で構成されている点で、実際の生体内の状態とは大きく違い、本実験結果を解釈する上でMHCの相違による影響は常に念頭において考える必要があると考えられる。

## 2. 正常内皮細胞および炎症性刺激の加わった内皮細胞に対するLAK細胞の接着、遊走能について

LAK細胞は非刺激PBLと比べ、正常内皮に強く接着するだけでなく、その下層への遊走も明らかに高度であった。この変化は非常に短時間(1-2時間)のrIL-2刺激でも既に認められ、7日間の培養ではほぼ最大値をとった。In vitroの実験系では(本実験とは異なった方法であるが)、PDB(phorbol dibutyrate)や $Ca^{2+}$  ionophoreで活性化したT細胞は非刺激T細胞に比べより高い内皮細胞下遊走能を示すことが、既に報告されている<sup>16)</sup>。これらの結果は、In

Vitro の系で見る限り、リンパ球はその活性化に伴い、より強い内皮下遊走能を獲得することを示唆すると考えられる。

本研究で注目されるのは、PBLに比べ、LAK細胞の接着率の増加は最大で5-6倍であるの対し、LAK細胞の遊走率の増加は40-50倍とさらに顕著な変化を示したことである。これはLAK細胞の遊走能の増加が単に内皮への接着能の増加にのみ依存したものではなく、接着後の内皮下への移動の段階における変化に強く依存していることを示唆するものと考えられた。

また至適濃度の $rIL1-\beta$ 、 $rTNF-\alpha$ 、および $rIFN-\gamma$ で内皮を24時間刺激した場合、PBLの接着、遊走は非刺激の内皮細胞に対するものと比べ明かに増強し、その変化率は過去の報告<sup>33-35)</sup>と類似していた。一方、LAK細胞においては、内皮の炎症性サイトカイン刺激によって、接着率は有意な変化を示さず、内皮下遊走率は1.3-1.5倍と有意な増加を示したが、この変化もPBLの遊走率の増加と比較すると明らかに軽度であった。

これらの結果から推測すると、非刺激PBLと比較して、LAK細胞は血管内よりIn Vivoに投与された場合、炎症の有無に関わらず、解剖学的に最初に遭遇した血管床の内皮細胞に強く接着し、しかもその内かなり多くの細胞がその下層に遊走する能力を有しているものと考えられた。

### 3. LAK細胞の内皮下遊走能の増強に関わる諸因子について

#### (接着分子からの検討)

一般に白血球の内皮下への移行は、1)血流に抗して内皮細胞にひっかかり(anchoring or tethering)、内皮細胞上をころがる段階(rolling)、2)新たな接着分子の機能的活性化による内皮細胞への固着(Firm adhesion)、さらに3)内皮細胞間をぬけて下層へ移行する段階(Migration)といういくつかのステップに分けられ、1)では白血球および内皮細胞上のSelectin familyに属する分子と糖鎖、2)-3)では、白血球上のIntegrinと内皮細胞上のImmunoglobulin Familyに属する分子がおもに関与していることが報告されている<sup>20, 26-30)</sup>。

抗接着分子抗体による抑制実験において、LAK細胞のHUVECへの接着は抗LFA-1抗体、抗ICAM-1抗体によって軽度抑制され(抗LFA-1抗体21-23%、抗ICAM-1抗体10%程度)、さらにこの系に抗VLA-4抗体を加えることで抑制率の有意な増強を認めた。この結果はLAK細胞の内皮への接着には、 $\beta 2$ 及び $\beta 1$  Integrinが関与していることを表わしており、これはPBLの内皮への接着についての報告<sup>12, 19-20)</sup>と一致していた。しかし、LAK細胞の場合、これらの抗Integrin抗体を併用しても、内皮への接着は最大限30%程度しか



抑制し得ず、この細胞間の接着にはさらに別の接着経路が強く関与していることが示唆された。

そこで、その候補として、過去にリンパ球と内皮の接着に関与していると報告されている CD44分子に注目した<sup>39)</sup>。しかし、本実験系で検討した限り、抗 CD44 抗体は LAK 細胞の内皮への接着には全く影響を及ぼさなかった。ただし、本実験に使用した二種類の抗 CD44 抗体、A3D8、J173は、過去の報告で使用された抗 CD44 抗体、Hermes-3 抗体と異なり、PBL と HUVEC との接着をも抑制しなかった。したがって、本実験の結果は、この二種の抗体は CD44 分子中の Hermes-3 抗原とは異なった Epitope を認識しており、これらの抗体で認識される Epitope は LAK 細胞のみならず一般のリンパ球と内皮の接着には関与しないことを示していた。A3D8、J173 はそれぞれ T-cell と赤血球<sup>40)</sup>、癌細胞とヒアルロン酸<sup>41)</sup>の接着を抑制することが過去に報告されており、本実験結果はむしろ、CD44 分子はいくつかのリガンドに対する異なった接着 Epitope を有していることを示唆するものと考えられた。

接着実験の結果とは対照的に、LAK 細胞の遊走能は抗 LFA-1 抗体、抗 ICAM-1 抗体によって著明に抑制され(抗 LFA-1 抗体で 75-80%、抗 ICAM-1 抗体で 40-60%)、内皮下への遊走現象のうち接着以降の段階は主に LFA-1-ICAM-1 経路に強く依存していることが示された。

また rIL-1 $\beta$ 、及び rIFN- $\gamma$  で刺激した HUVEC に対する遊走能もこの二種の抗体で強く抑制され、その存在下での遊走率は、非刺激の HUVEC に対し同一抗体で抑制実験を行なった時とほぼ同じレベルまで低下し、内皮の活性化に伴う遊走能の増強も同様に LFA-1-ICAM-1 経路に強く依存していることが示唆された。

リンパ球の Chemotactic ないし Chemokinetic な運動能力もこの遊走現象に強く関与していると思われる。リンパ球の運動能に関する研究は比較的少なく、この点に関しては現在も十分に解明されていない点が多いが、抗原や Mitogen で刺激されたリンパ球は、細胞形態が若干変化する (Locomotor shape をとる) こと、Collagen gel 内への浸潤能が増すこと、Chemoattractant に対する走化性が増すこと、などが既に報告されている<sup>42-43)</sup>。また Microchemotactic chamber を用いた実験によって、リンパ球は LCF (lymphocyte chemotactic factor)<sup>44)</sup>, IL-2<sup>45)</sup>, IL-8<sup>46)</sup>, 及び RANTES<sup>47)</sup> に対する Chemotaxis を有しており、しかもその Chemotaxis は抗 LFA-1 抗体によって著明に抑制されることも明らかにされている<sup>48)</sup>。本実験系においても、HUVEC の存在しないゲルに対して、LAK は PBL よりも明かに強い遊走能を有しており、内皮下への遊走は抗 LFA-1 抗体によって強く抑制され、その抑制率は内皮への接着におけるものよりもはるかに高度であった。これらの事実を考

慮すると、LFA-1分子はLAK細胞を含めたリンパ球の運動機能と密接な関係があり、内皮下遊走現象においても、その後期、すなわち細胞の移動の段階でより重要な役割を演じているものと考えられた。

これらの事実を総合的に解釈すると、LAK細胞の血管内皮下遊走能の増加現象には、Integrinを含めたいくつかの接着経路に依存した内皮への接着能の増加と、活性化したLFA-1分子に主に依存した運動能の増強という二つの要素によって説明されうると考えられた。

#### 4. LAK細胞のPhenotypeと内皮下遊走能との関連

さてLAK細胞はCD3(+)のT-LAKとCD3(-)CD56(+)ないしCD16(+)のphenotypeで表現されるNK-LAKの二種類に大別され、前者はさらにCD4(+)およびCD8(+)T-LAKに分類される。従来の研究では、LAKのうちCD16(+)NK-LAKが腫瘍細胞に対し最も強い細胞障害活性を有しており、この分画がLAKの抗腫瘍効果を主に担っていると解釈されていた<sup>49-50)</sup>。しかし、近年、CD4(+)T細胞やCD8(+)T細胞のうち細胞障害活性を有しないものもIn Vivoで強い抗腫瘍効果を有していることが確認されてきており<sup>51-52)</sup>、LAK細胞に代表される活性化リンパ球のうちいずれのPhenotypeがIn Vivoでの抗

腫瘍効果を担っているかという点については明確な回答が得られていない。したがって、LAKのうちどのPhenotypeが最も強い内皮細胞下遊走能を有しているかという点について検討を加えることは、In VivoにおけるLAKの抗腫瘍作用のメカニズムを考える上でも重要な事と考えられる。

本実験結果によると、CD8(+)T-LAKがCD4(+)T-LAKに比べ明らかに強い内皮下遊走能を有しており、CD16(+)またはCD3(-)CD56(+)NK-LAKは内皮に強く接着するが、下層に遊走する能力はむしろ乏しいことが示された。したがって、血管内に投与したNK-LAKはIn Vitroでは強い細胞障害作用を有しているが、血管内に投与した場合、同様に強い細胞障害作用を持つCD8(+)T-LAKと比較して、腫瘍組織内に浸潤する能力に欠け、十分な細胞障害活性を発揮しえない可能性があることが推測された。

しかし、内皮をあらかじめrIFN- $\gamma$ で刺激しておくと、CD16(+)NK-LAKはその下層へ強く遊走し、HUVECに接着、非遊走群の中のNK-LAKの割合は逆に低下した。この原因については、本研究の範囲では明らかにできず、LAKとHUVECのMHCの相違によるAlloの反応が関与している可能性も否定し得なかったが、この結果をそのまま解釈すると、炎症等の刺激により、腫瘍局所にIFN- $\gamma$ が高濃度に存在すると、CD16(+)NK-LAKの腫瘍内浸潤が増加し、LAK療

法の治療効果に変化をもたらしている可能性があると考えられた。

## 5. 今後の問題点についての検討

経静脈的に投与された LAK細胞は、数時間肺に留まるが、その後大部分は肝、脾の網内系に移行するという追跡実験の結果<sup>8-9)</sup>は、リンパ球の活性化に伴う Homing receptor (L-selectin)の発現低下と関連づけて考えられ、LAK細胞は生体組織内に浸潤する能力が欠如していると考えられてきた<sup>5,2)</sup>。本実験の結果はこの研究結果と相反するように思われる。しかし、近年リンパ球と内皮との Interaction に関わる分子はこれ以外にも多数存在し、それぞれが密接な関係を保ちつつ浸潤現象を引き起こすこと、L-Selectin は浸潤の初期の段階、すなわち血流に抗して血管床に接着する Tethering の段階にのみ関与し、それ以降の段階には関与しないこと<sup>36-38)</sup>、また Integrin Family に属する LFA-1分子の機能、および膜上の発現は L-Selectinとは対照的に、PBLに比べ LAK細胞において明かに増強していること<sup>19,22)</sup>、しかも接着以降の遊走段階においては LFA-1分子が強く関与していたこと、などを考慮に入れると本実験結果は理にかなうと考えられる。しかし、本実験系では血流の作用のない静止状態で実験を施行しているため、L-Selectinの関与するとされる Tetheringの段階については

検討に入れていない。また、Shear Stressの存在下に内皮細胞上のE-SelectinやP-Selectinと反応するとされているsialyl-Le<sup>x</sup>抗原はNK細胞、及びある種の活性化T細胞上に発現していることも既に知られており<sup>54-55)</sup>、これらの接着分子もLAK細胞の内皮細胞下への遊走に強く関与している可能性も充分考えられる。したがって、これらのSelectinと糖鎖を介した接着反応が静止条件下で得られた本実験結果とIn Vivoの追跡実験結果との矛盾点と深く関連していると推測される。しかし、前述の追跡実験においても、投与した培養細胞の挙動をIsotopeのtraceのみで検討しているため、それぞれの計測値がそのまま臓器に存在する活性を持った細胞量を直接反映しているかどうかという点についての疑問は残る。さらに、Shearの存在下では、顆粒球の内皮への接着がDextran Sulfateによって強く抑制されることも既に報告されており<sup>56)</sup>、血流によるShear Stressの存在下でのLAKと内皮のInteractionについてをさらに深く検討する事が今後の重要な課題であると考えられる。

本研究によってLAK細胞は一般の内皮細胞に対して強い遊走能を有することが明かとなったが、腫瘍血管内皮細胞に対しても同様の能力を示すか否かはもう一つの重要な問題点である。腫瘍組織における血管内皮細胞の特異性に関しては分子レベルでの知見



はほとんど得られていない。しかし、Isotopeや蛍光で標識した細胞を用いた追跡実験では、TILのみならず、In Vitroで腫瘍細胞に感作させたリンパ球(CTL)や Adherent-LAK細胞も健常部位よりは腫瘍部位により多く集積する傾向があることが既に報告されている<sup>18-21, 57)</sup>。またウサギに移植した腫瘍の系で、局所の動脈から Adherent-LAK細胞を還流すると、健常組織に比して腫瘍組織により多く捕捉されることも顕微鏡下で確認されている<sup>58)</sup>。これらの知見は、これらの培養リンパ球は健常組織の血管内皮より、腫瘍血管床により効果的に接着し、下層へ遊走する可能性がある事を示唆するものである。

腫瘍血管は正常血管に比べ、明らかに曲折した複雑な解剖学的構築をしており、血流による Shear Stressも正常血管におけるものとは明らかに異なっていると考えられる。また腫瘍組織では内皮間の物質の透過性は増加しているが、リンパの Drainageが未発達なため、腫瘍内の間質圧が著しく高く、毛細血管内圧との圧格差がほとんどなくなっており、これが薬物の腫瘍内への到達を困難にしていることも示唆されている<sup>59-60)</sup>。したがって、腫瘍組織における LAK細胞の浸潤現象には、接着分子や Chemoattractantのみならず、腫瘍血管の生理学的、解剖学的特徴が大きく関与していると考えられる。さらに、内皮細胞の下層に存在する基底膜

や間質の構成、それを破壊する様々な酵素の産生能なども白血球の組織浸潤現象に深く関わっていることは容易に推測され、今後この観点からも検討も必要であると考えられる。

さて、現時点での癌養子免疫療法の臨床応用にあたっての最大の問題点は、In Vivo に投与された培養細胞が如何なるメカニズムで癌の進行を抑制するかという根本的命題が未だに充分解明されてない事であろう。しかるに、従来の研究では、培養細胞の抗腫瘍効果の判定はもっぱらIn Vitroにおける細胞障害活性を指標として行なわれており、如何にして自己腫瘍細胞に対して高い細胞障害活性を有する細胞を大量に作成するかという事にのみ主眼がおかれてきたきらいがある。しかし、LAKやCTL等のエフェクター細胞のIn Vivoにおける抗腫瘍効果の少なくとも一部は、その産生するTNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ などの抗腫瘍性サイトカインや、腫瘍血管内皮細胞の障害などに依存していることが明かにされ<sup>61-62)</sup>、エフェクター細胞による腫瘍退縮現象には直接的な腫瘍細胞障害作用のほかに様々な機構が関与している可能性が示唆されてきている。より有効な免疫療法の開発には、リンパ球に代表される免疫担当細胞と、腫瘍間質、腫瘍血管などのMicroenvironmentとの相関を考慮に入れた多角的な研究の必要性を認識すべきであると考えられる。

## まとめ

1. LAK細胞はPBLに比べ、内皮細胞に高率に接着するだけでなく、非常に強い内皮下遊走能をも有していた。

2. LAK細胞の内皮下遊走能は炎症性サイトカインによる内皮細胞の活性化によって若干の増強を示したが、その変化率はPBLと比べ明かに軽度であった。

3. LAK細胞の内皮への接着にはLFA-1, VLA-4分子が関与していたが、その割合はPBLの内皮への接着の場合と比べ明らかに小さかった。これに対し、LAK細胞の内皮下遊走はLFA-1分子に強く依存していた。

4. LAK細胞のphenotypeのなかでは、CD8(+)T-LAKが最も強い内皮下遊走能を有しており、CD16(+)NK-LAKは内皮に強く接着するが、遊走能はむしろ乏しかった。しかし内皮をあらかじめrIFN- $\gamma$ で刺激しておくと、内皮下に遊走するNK-LAKの割合は著しく増加した。

## 結 語

本実験結果と現在までの知見を総合すると、LAK細胞を腫瘍の支配血管から局所投与すると、LAKは解剖学的に最初に遭遇する腫瘍血管内皮細胞に強く接着し、さらにその内の多くが内皮下へ遊走しうる事が予想される。したがって、この方法で投与されたLAK細胞は全身投与に比べ、より効率的に腫瘍内に到達し、より強い抗腫瘍効果を発揮することが期待される。近年、いくつかの施設でLAK細胞の腫瘍支配動脈内投与が試みられ、比較的よい臨床成績が得られている<sup>63-64)</sup>。本実験結果はこの臨床結果を支持するものと考えられる。

またLAKのPhenotypeについての実験結果から、炎症性刺激などにより腫瘍局所にIFN- $\gamma$ に代表されるサイトカインが高濃度に存在すると、腫瘍内へ浸潤する細胞の数ばかりでなく、その種類が制御され、これが治療効果に大きな影響を与えている可能性が示唆された。白血球の腫瘍内浸潤機構にさらに詳細な検討を加えることによって、培養細胞の局所血管内投与に加え、ある種のrecombinant cytokineの腫瘍内局所注入を併用し、抗腫瘍性細胞を選択的かつ効果的に腫瘍内に誘導する方法が見いだせれば、さらに有効な癌治療法の確立につながるものと考えられた。

参考文献

1. Rosenberg S.A., M.T. Lotze, L.M. Mull, S. Leitman, A.E. Chang, S.E. Ettinghausen, Y.L. Matory, J.M. Skibber, E. Shiron, J.T. Vetto, C.A. Seipp, C.G. Simpson, C.M. Reichart. 1985. Observation on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant Interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *New Eng. J. Med.* 313:1485
2. Rosenberg S.A., M.T. Lotze, J.C. Yang, P.M. Aebersold, W.M. Linehan, C. A. Seipp, and D. E. White. 1989. Experience with the use of high-dose Interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann.Surg.* 210:474.
3. Rosenberg, S.A., M.T. Lotze, L.M. Muul, A.E. Chang, F.P. Avis, S. Leitman, W.M. Linehan, C.N. Robertson, R.E. Lee, J.T. Rubin, C.A. Seipp, C.G. Simpson, D.E. White. 1987. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and Interleukin-2 or high dose Interleukin-2 alone. *N. Eng. J. Med.* 316:889.
4. Rosenberg, S.A., P. Spiess, R.A. Lafreniere. 1986. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-Infiltrating lymphocytes. *Science* 233:1318
5. Kradin, R.L., J.T. Kurnick, D.S. Lazarus, F.I. Pfeffer, S.M. Dubinett, C.E. Pinto, J. Gifford, E. Davidson, B. Grove, R.J. Charahan, H.W. Strauuss 1989. Tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the treatment of advanced cancer. *Lancet* 1:577
6. Syu, S., T. Chou, K. Sakai 1989. Lymphocytes generated by in vivo sensitization demonstrate therapeutic efficacy against a murine tumor that lacks apparent immunogenicity. *J. Immunol.*

7. Chang, A.E., H. Yoshizawa, K. Sakai, M.J. Cameron, V.K. Sondak, S. Syu. 1993. Clinical observations on adoptive immunotherapy with vaccine-primed T lymphocytes secondary sensitized to tumor in vitro. *Cancer Res.* 53:1043
8. Lotze, M.T., B.R. Line, D.J. Mathisen, and S.A. Rosenberg. 1980. The in vivo distribution of autologous human and murine lymphoid cells grown in T cell growth factor (TCGF). *J. Immunol.* 125:1487.
9. Maghazachi, A.A., R.B. Herberman, N.C. Vujanovic, and J.C. Hiserodt. 1988. In vivo distribution and tissue localization of highly purified rat lymphokine activated Killer (LAK) cell. *Cell. Immunol.* 115:17913.
10. Fisher, B., B.S. Packand, E.J. Read, J.A. Carrasquillo, C.S. Carter, S.L. Topalian, J.C. Yang, P. Yolles, S.M. Lason, and S.A. Rosenberg 1989. Tumor localization of adoptively transferred Indium-111 labeled tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 17:250.
11. De Jong, W.H., M.M.T. Van de Plas, P.A. Steerenberg, W. Kruizinga, and E.J. Ruitenberg. 1985. Selective localization of tumor-immune spleen cells at the tumor challenge-site after adoptive transfer of line 10 tumor immunity in strain 2 guinea pigs. *J. Immunol.* 134:2032.
12. Pober, J.S., and R.C. Cotran. 1991. Immunologic interaction of T lymphocytes with vascular endothelium. *Adv.in Immunology* 50:261.
13. Cavender, D.E. 1990. Organ-specific and non-organ-specific



lymphocyte receptors for vascular endothelium.

J. Inv. Dermatol. 94:41S.

14. Moser, R., B. Schleiffenbaum, D. Groscurth, and J. Fehr 1989. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. J. Clin. Invest. 83:444
15. Oppenheimer-Marks, N., and M. Ziff 1988. Migration of lymphocytes through endothelial cell monolayers: Augmentation by interferon- $\gamma$ . Cell. Immunol. 114:307.
16. Oppenheimer-Marks, N., L.S. Davis, and P.E. Lipsky 1990. Human T lymphocyte adhesion to endothelial cells and transendothelial migration. J. Immunol. 145:140
17. Smith, C.W., R. Rothlein, B.J. Hughes, M.M. Mariscalco, H.E. Rudloff, F.C. Schmalstieg, and D.C. Anderson 1988. Recognition of an endothelial determinant for CD18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. J. Clin. Invest. 82:1746.
18. Smith, C.W., S.D. Martin, R. Rothlein, C. Toman, and D.C. Anderson 1989. Cooperative interaction of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. J. Clin. Invest. 83:2008.
19. Springer, T.A. 1990. Adhesion receptors of immune system. Nature 346:425
20. Shimizu, Y., W. Newman, Y. Tanaka, and S. Show 1992. Lymphocyte interactions with endothelial cells. Immunol. Today. 13:106.
21. Shimizu, Y., G.A.V. Seventer, K.J. Horgan, and S. Show

1990. Regulated expression and binding of three VLA( $\beta$ 1)-  
integrin receptors on T cells. *Nature*. 345:250
22. Robertson, M.J., M.A. Caligiuri, T.J. Manley, H. Levine, J.  
Ritz 1990. Human natural killer cell adhesion molecules.  
Differential expression after activation and participation in  
cytolysis. *J. Immunol.* 145:3194
23. Imamura, T., and Y. Mitsui. 1987. Heparan sulfate and heparin  
as a potentiator or a suppressor of growth of normal and  
transformed vascular endothelial cells. *Exp. Cell. Res.* 172:92
24. Bruning, J.W., M.J. Kardol, and R. Arentzen 1980. Carboxyl  
fluorescein fluorochromasia analysis I. Non-radioactively  
labeled cell mediated lympholysis. *J. Immunol. Methods.* 33:33
25. Masuyama J.I., J.S. Berman, W.W. Cruikshank, C. Morimoto, and  
D.M. Center. 1992. Evidence for recent as well as long term  
activation of T cells migrating through endothelial cell  
monolayers in vitro. *J. Immunol.* 148:1367.
26. Huber, A.R. and S.J. Weiss. 1989. Disruption of the  
subendothelial basement membrane during neutrophil diapedesis  
in an in vitro construct of a blood vessel wall. *J.*  
*Clin. Invest.* 83:1122.
27. Furie, M.B., B.L. Naprestek, and S.C. Silverstein 1987.  
Migration of neutrophils across monolayers of cultured  
microvascular endothelial cells: An in vitro model of  
leukocyte extravasation. *J. Cell. Sci.* 88:161.
28. Furie, M.B., and D.D. McHugh. 1989. Migration of neutrophils  
across endothelial monolayers stimulated by treatment of the  
monolayers with interleukin-1 or tumor necrosis factor- $\alpha$ .

J. Immunol. 143:3309.

29. Kitayama, J., N. Tuno, T. Juji, T. Muto 1993. Suppression of tumor growth by LAK cells: Probable effect on the angiogenesis. Proceedings of 84th annual meeting in american association for cancer research.448
30. Damle, N.K., L.V. Doyle, J.R. Bender, and E.C. Bradley. 1987. Interleukin 2-activated human lymphocytes exhibit enhanced adhesion to normal vascular endothelial cells and cause their lysis. J. Immunol. 138: 1779.
31. Mier, J.W., E.P. Brandon, P. Cibby, M.W. Janicka, and F.R. Aronsos 1989. Activated endothelial cells resist lymphokine activated killer cell-mediated injury. J. Immunol. 143:2407.
32. Kotasek, D.K., G.M. Vercellotti, A.C. Ochoa, F.H. Bach, J.G. White, and H.S. Jacob. 1988. Mechanism of cultured endothelial injury induced by lymphokine activated killer cells. Cancer. Res. 48:5528.
33. Cavender, D.E., D.O. Haskard, B. Joseph, and M. Ziff 1986. Interleukin-1 increases the binding of human B and T lymphocytes to endothelial cell monolayers. J. Immunol. 136:203.
34. Cavender, D.E., Y. Saegusa, and M. Ziff 1987. Stimulation of endothelial cell binding of lymphocytes by tumor necrosis factor. J. Immunol. 139:1855.
35. Hasard, D.O., D.E. Cavender, R. M. Fleck, R. Sontheimer, and M. Ziff 1987. Human dermal microvascular endothelial cells behave like umbilical vein endothelial cells in T cell adhesion studies. J. Invest. Dermatol. 88:340.
36. Kishimoto, T.K., M.A. Jutila, E.L. Berg, and E.C. Butcher

1989. Neutrophil Mac-1 and Mel-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science*. 245:1238.
37. Kishimoto, T. K., M. A. Jutila, and E. C. Butcher 1990. Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:2244.
38. Lawrence, M.B., T.A. Springer. 1991. Leukocytes roll in selection at physiologic flow rates; Distinction from prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*. 65:859.
39. Jalkanen, S., R.F. Gargatze, J. de los Toyos, and E.C. Butcher 1987. Lymphocyte recognition of high endothelium: antibodies to distinct epitopes of an 85-90kD glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymph-node, mucosal or synovial endothelial cells. *J. Cell Biol.* 105:983.
40. Hale, L.P., K.H. Singer, and B.F. Haynes. 1989. CD44 antibody against In(Lu)-related p-80, lymphocyte-homing receptor molecule inhibits the binding of human erythrocytes to T cells. *J. Immunol.* 143:3944.
41. Culty, M., K. Miyake, P.W. Kincade, E. Silorski, E.C. Butcher, and C. Underhill 1990. The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. *J. Cell Biol.* 111:2765.
42. Wilkinson P.C. 1986. The locomotor capacity of human lymphocytes and its enhancement by cell growth. *Immunol.* 57: 281.
43. Wilkinson P.C. 1987. OKT3-activated locomotion of human

blood lymphocytes; a phenomenon requiring contact of T cells with Fe-receptor-bearing cells. *Immunol.* 60:445.

44. Center, D.M., and W. Cruikshank. 1982. Modulation of Lymphocyte migration by human lymphokines. 1. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. *J. Immunol.* 128:2563.
45. Hardy, K., J.S. Berman, D.J. Beer, and D.M. Center 1985. Induction of human T lymphocyte motility by interleukin-2. *J. Immunol.* 134:3887.
46. Larsen, C.G., A.N. Anderson, E. Appella, J.J. Oppenheim, and K. Matsushima 1989. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science.* 243:1461.
47. Schall, T.J., K. Bacon, K.J. Toy, and D.V. Goeddel 1990. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature.* 347:669.
48. Van Epps, D.E., J. Potter, M. Vachula, C.W. Smith, and D.C. D.C. Anderson. 1989. Suppression of human lymphocyte chemotaxis and transendothelial migration by anti-LFA-1 antibody. *J. Immunol.* 143:3207.
49. Herberman, R.B., J.C. Hiserodt, N. Vujanovic, C. Balch, E. Lotzova, R. Bolhuis, S. Golub, L. L. Lanier, J. H. Phillips, C. Riccardi, J. Ritz, A. Santoni, R. E. Schmidt, and A. Uchida 1987. Lymphokine-activated killer cell activity characteristics of effector cells and their progenitors in blood and spleen. *Immunol. Today.* 8:178.
50. Ortaido, J.R., A. Mason, R. Overton. 1986. Lymphokine-



activated killer cell; analysis of progenitors and effectors.  
J. Exp. Med, 164:1193.

51. Prat, M.S., S. Bretti, M. Amedeo, S. Landolfo, and P.M. Comoglio. 1987. Monoclonal antibody against IFN $\gamma$  abrogates in vivo tumor immunity against RSV-induced murine sarcomas. J. Immunol. 138:4530
52. Nagarkatti, M., S.R. Clary, and P.S. Nagarkatti. 1990. Characterization of tumor infiltrating CD4(+) T cells as Th1 cells based on lymphokine secretion and functional properties. J. Immunol. 144:4898.
53. Steen, P.D., J.R. McGregor, C.M. Lehman, W.E. Samlowski 1989. Changes in homing receptor expression on murine lymphokine activated killer cells during IL-2 exposure. J.Immunol. 143:4324
54. Ohmori, K., Takada, A., Yoneda, T., Buma, Y., Hirashima, K., Tsuyuoka, K., Hasegawa, A., Kannagi, R. 1993 Differentiation-dependent expression of sialyl stage-specific embryonic antigen-1 and I antigens on human lymphoid cells and its implications for carbohydrate-mediated adhesion to vascular endothelium. Blood 81:101
55. Springer, T.A., and Lasky, L.A. 1991. Sticky sugars for selectins. Nature 349:196
56. Ley, K., Lundgren, E., Berger, E., Arfors, K.E. 1989. Shear dependent inhibition of granulocyte adhesion to cultured endothelium by dextran sulfate. Blood 73:1324
57. Basse, P., R.B. Herberman, U. Nannmark, B.R. Johansson, M. Hokland, K. Wasserman, and R.H. Goldfarb. 1991. Accumulation



- of adoptively transferred adherent, lymphokine activated killer cells in murine metastasis. *J. Exp. Med.* 174:479.
58. Sasaki, A., R.J. Melder, T.L. Whiteside, R.B. Herberman, and R.K. Jain. 1991. Preferential localization of human adherent LAK cells in tumor microcirculation. *J. Natl. Cancer Inst.* 83:433.
59. Jain, R.K. 1987. Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Metastasis Rev.* 6:559.
60. Jain, R.K. 1989. Delivery of novel therapeutic agents in tumors : physiological barriers and strategies. *J. Natl. Cancer Inst.* 81:570.
61. Barth, R.J., J.J. Mule', P.J. Spiess, and S.A. Rosenberg 1991. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor have a role in tumor regression mediated by murine CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 173:647
62. Cotran, R.S., J.S. Pober, M.A. Gimbrone, T.A. Springer, E.A. Wiebke, A.A. Gaspari, S.A. Rosenberg, M.T. Lotze 1988. Endothelial activation during interleukin-2 immunotherapy : a possible mechanism for the vascular leak syndrome. *J. Immunol.* 140:1883
63. Mavlight, G.M., A.A. Zukiwski, and J.V. Guttermann. 1990. Splenic versus hepatic artery infusion of interleukin-2 in patients with liver metastasis. *J. Clin. Oncol.* 8:319
64. Keiholtz, V., P. Schlag, W. Tilgen, B. Brado, F. Galm, J. Gölich, G. W. Kauffmann, P. Möller, S. Shneider, and W. Hunstein. 1992. Regional administration of Lymphokine-activated-Killer cells can be superior to intravenous application. *Cancer.* 69:2172.

Table 1. The % cytotoxicity of LAK cells against HUVEC

| Target             |      | E/T ratio     |                |
|--------------------|------|---------------|----------------|
|                    |      | 1 : 1         | 10 : 1         |
| HUVEC              | 4hr  | 2.6 $\pm$ 1.1 | 49.5 $\pm$ 3.8 |
|                    | 12hr | 3.9 $\pm$ 1.4 | 72.4 $\pm$ 5.9 |
| autologous<br>PBML | 4hr  | 0.7 $\pm$ 0.3 | 3.3 $\pm$ 2.1  |
|                    | 12hr | 2.1 $\pm$ 0.9 | 4.3 $\pm$ 3.1  |

The percent cytotoxicity against HUVEC and autologous PBML was examined by  $^{51}\text{Cr}$  release. Each value represents mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

Table 2. The adhesion and migration activity of PBL stimulated with 1000u/ml r-IL2 for various time.

| Duration<br>of culture | Adhesion |          | Migration |          |
|------------------------|----------|----------|-----------|----------|
|                        | HUVEC(+) | HUVEC(-) | HUVEC(+)  | HUVEC(-) |
| 0                      | 15.8±1.0 | 5.8±1.1  | 0.6±0.1   | 1.9±0.7  |
| 1hr                    | 21.0±2.1 | 4.9±0.7  | 2.3±0.4   | 4.8±1.1  |
| 3hr                    | 22.9±1.3 | 5.7±1.3  | 2.6±1.3   | 5.9±1.7  |
| 6hr                    | 25.7±1.6 | 6.0±1.0  | 2.3±0.8   | 7.4±2.9  |
| 1day                   | 40.0±1.7 | 14.8±2.9 | 6.4±1.6   | 9.9±3.1  |
| 3day                   | 68.7±2.3 | 24.8±5.2 | 7.0±2.5   | 15.2±4.4 |
| 7day                   | 76.7±4.1 | 16.8±2.9 | 12.0±3.4  | 26.0±5.2 |
| 14day                  | 69.6±2.1 | 15.0±1.8 | 16.6±2.9  | 28.8±5.4 |
| 21day                  | 69.0±1.9 | 9.6±2.9  | 14.7±1.8  | 21.9±4.4 |

The percent adhesion to HUVEC and gelatin surface without HUVEC was assessed by 30 min adhesion assay, and the percent migration to collagen gel with or without HUVEC was examined by 6 hour migration assay. Each value represents the mean±SD in triplicate.

Table 3. The percentages of positive cells in adhesive and migratory LAK cell populations

| exp. | CD4       |           |          |  | CD8      |          |          |
|------|-----------|-----------|----------|--|----------|----------|----------|
|      | pre       | ad        | mig      |  | pre      | ad       | mig      |
| 1.   | 26.4      | 15.7      | 13.7     |  | 40.0     | 40.4     | 40.0     |
| 2.   | 56.2      | 34.0      | 25.1     |  | 32.0     | 50.6     | 54.1     |
| 3.   | 8.6       | 8.4       | 4.3      |  | 38.6     | 42.0     | 59.8     |
| 4.   | 39.1      | 31.8      | 18.8     |  | 46.4     | 44.8     | 62.9     |
| m.   | 32.5±17.5 | 22.5±10.8 | 15.5±7.6 |  | 39.3±5.1 | 44.5±3.9 | 55.2±7.2 |

| exp. | CD16    |          |         |  | CD3(-)CD56(+) |          |         |
|------|---------|----------|---------|--|---------------|----------|---------|
|      | pre     | ad       | mig     |  | pre           | ad       | mig     |
| 1.   | 9.3     | 14.1     | 1.0     |  | -             | -        | -       |
| 2.   | 4.4     | 11.7     | 5.3     |  | 6.3           | 9.6      | 3.2     |
| 3.   | 10.0    | 20.4     | 1.7     |  | 11.5          | 21.6     | 3.5     |
| 4.   | 6.3     | 7.4      | 3.1     |  | 7.2           | 12.7     | 5.5     |
| m.   | 7.5±2.3 | 13.4±4.7 | 2.8±1.6 |  | 8.3±2.7       | 14.6±5.1 | 4.1±1.0 |

1x10<sup>6</sup> HUVEC were cultured on collagen gel in 60mm x15mm culture dish until confluence, washed twice with CM, to which 1x10<sup>6</sup> LAK cells (Pre) was added, and incubated upside down. Six hours later, supernatant containing nonadherent LAK cells was removed by aspiration. Adherent LAK cells which had not migrated (Ad) were collected with HUVEC by several gentle washings with 0.02% EDTA + 0.25% Trypsin. Then the migratory LAK cells (Mig) were collected by means of gel digestion as described in Materials and Method. The phenotype of each LAK cell populations (Pre, Ad, Mig) was analyzed by FACStar. The value shown represents the relative percentage of each phenotype in CD45(+) lymphocytes.

Table 4. The percentages of CD16(+) cells in adhesive and migratory LAK cell population through INF $\gamma$  treated and non treated HUVEC.

| exp. | pre            | normal HUVEC   |               |  | INF treated HUVEC |                 |
|------|----------------|----------------|---------------|--|-------------------|-----------------|
|      |                | ad             | mig           |  | ad                | mig             |
| 1.   | 4.4            | 11.7           | 5.3           |  | 7.4               | 15.0            |
| 2.   | 10.0           | 20.4           | 1.7           |  | 9.6               | 18.8            |
| 3.   | 22.0           | 29.6           | 9.7           |  | 30.0              | 40.3            |
| 4.   | 6.4            | 7.3            | 3.1           |  | 7.9               | 12.3            |
| m.   | 10.7 $\pm$ 6.8 | 17.3 $\pm$ 8.4 | 5.0 $\pm$ 3.0 |  | 13.7 $\pm$ 9.4    | 21.6 $\pm$ 11.0 |

1x10<sup>6</sup> HUVEC were incubated with or without 250u/ml r-IFN $\gamma$  for 24 hours. The LAK cells migrating across these HUVEC were collected, and the relative percentages of CD16(+) cells among CD45(+) lymphocytes were determined.

Figure 1. The method of migration assay

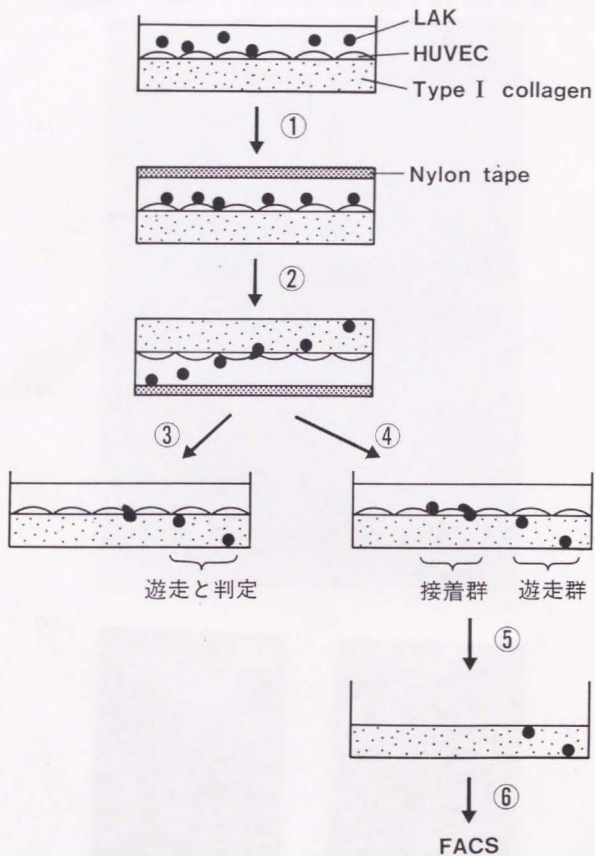
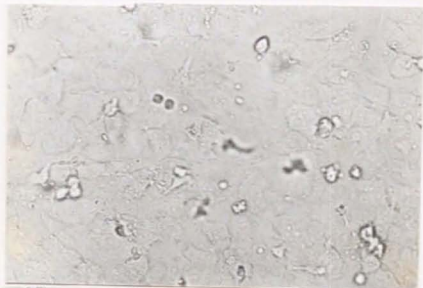




Figure-2. Figures of Adherent and Migratory LAK cells

(A)



(B)



(C)



(D)

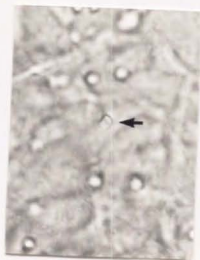


Figure 3. The time kinetics of transendothelial migration of PBL and LAK cells.

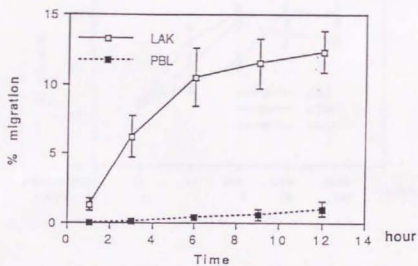


Figure 4. The change of adhesion and transmigration of PBL and LAK cells by the pre-treatment of HUVEC with r-IL1 $\beta$ , r-TNF $\alpha$ , and r-IFN $\gamma$ .

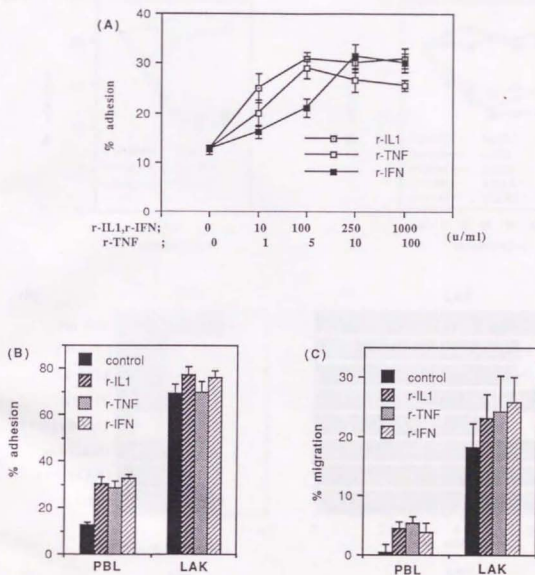


Figure 5. The effects of mAbs on the adhesion to r-IL1 $\beta$  treated HUVEC of PBL and LAK cells.

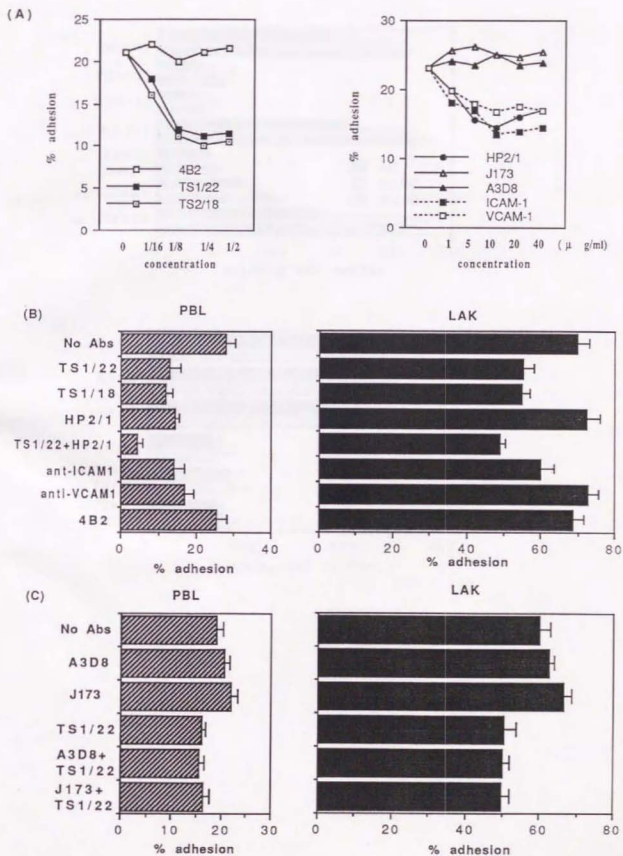
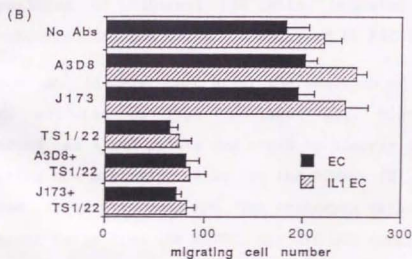
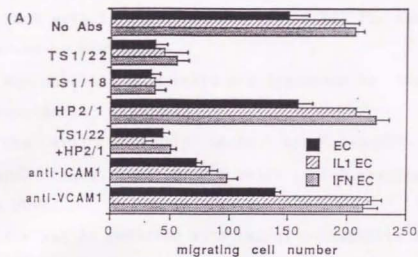


Figure 6. The effect of mAbs on LAK cell migration across HUVEC.



### Figure Legend

Figure 1. 1. The plate is centrifugated by 50Gx5min. Then, each well is filled with 37° C assay medium, and sealed by nylon tape.

2. Incubation in 37° C for 6 hours upside down.

3. Each well is gently washed by 4° C PBS for several times, and observed by microscope.

4. Non-adherent LAK cells are discarded by the aspiration of supernatant.

5. The well is gently washed by 0.02% EDTA+0.25% Trypsin for several times. Adherent LAK cells (non-migrating) are collected with HUVEC.

6. The gel is resolved with 1mg/ml collagenase and migrated LAK cells are collected by washing with PBS. Thereafter, the composition of adherent LAK cells, migrated LAK cells, and pre-experimental LAK cells is analysed by FACStar.

Figure 2. (A) Six hours after the addition of LAK cells onto HUVEC cultured on Type I Collagen Gel. Migrated cells were detected as black points and could be clearly distinguished from adhering non-migrating cells to the HUVEC. (B), (C) The well was washed twice with cold PBS. The procedure detached most of the adherent cells from the HUVEC, but did not completely disrupt the HUVEC monolayer, and migrated cells were detected more clearly (arrow). (D), the focus was adjusted below the monolayer. The adherent (non-migrating) cells became obscure, while migrated cells were clearly detected as open figures surrounded by the collagen gel matrix (arrow).

(A-B) x100, (C-D) x200.

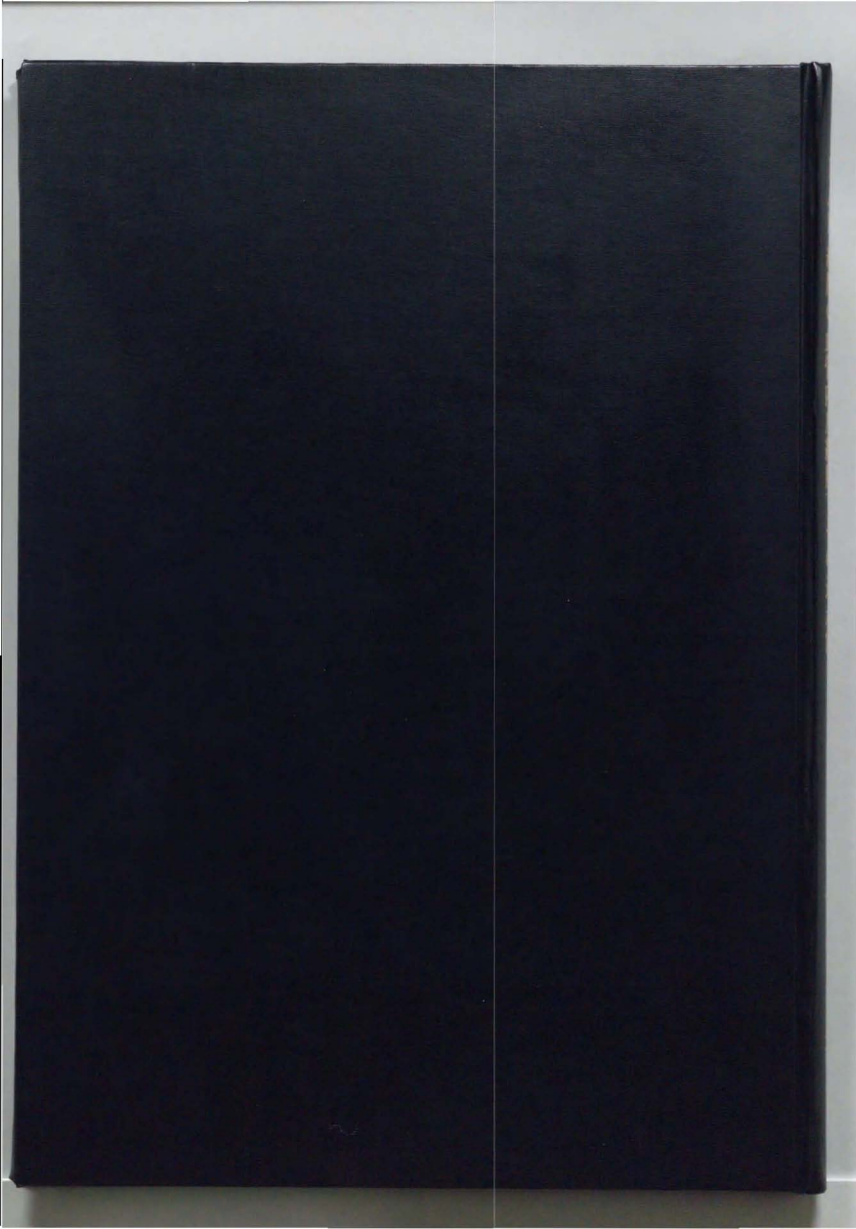


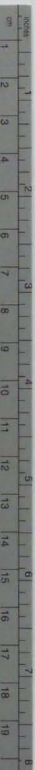
Figure 3. Time kinetics analysis of transendothelial LAK cell migration. Each value represents mean  $\pm$  SD of % migration determined for each incubation period.

Figure 4. (A) HUVEC were preincubated for 24 hour with 0-1000u/ml r-IL1 $\beta$  or r-IFN $\gamma$ , or 0-100u/ml r-TNF $\alpha$ , washed by assay medium, and the adhesion of PBL was assessed. LAK cell adhesion (B) and transendothelial migration (C) were examined against HUVEC stimulated with r-IL1 $\beta$  100u/ml, r-TNF $\alpha$  5u/ml or r-IFN $\gamma$  250u/ml. Values represent mean $\pm$ SD of one of the eight different experiments performed.

Figure 5 (A) The Effect of various concentration of mAbs on the adhesion of PBL to 100u/ml r-IL1 $\beta$  activated HUVEC. PBL pretreated with various concentration of mAbs to CD11a, CD18, CD49d, CD45 and CD44, were examined. MAb to ICAM-1 and VCAM-1 were added to HUVEC for 60 min and left there during the assay. (B),(C) The effect of the optimal concentration of mAbs on the adhesion to activated HUVEC of PBL(hatched bars) and LAK cells (closed bars). The results in one of the five (A) and two (B) different experiments are expressed. In this experiments, TS2/11, TS2/22, and 4B2 were used as 1:4 dilution of culture supernatant, and concentrations of HP2/1 and A3D8 were 10 $\mu$ g/ml, anti-ICAM-1 and anti-VCAM-1 were 20 $\mu$ g/ml, and J173 was 40 $\mu$ g/ml.

Figure 6. The effects of mAbs to LFA-1, ICAM-1, VLA-4, VCAM-1 (A) and CD44(B) on LAK cell migration across normal HUVEC or 100u/ml r-IL1 $\beta$  or 250u/ml r-IFN $\gamma$  activated HUVEC. Each blocking mAbs were used as described in the legend of Figure 4. Each value represents the mean $\pm$ SD of migrating cells in one of the four (A) and three (B) different experiments.





# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM, Kodak

Blue      Cyan      Green      Yellow      Red      Magenta      White      3/Color      Black



## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM, Kodak

A    1    2    3    4    5    6    M    8    9    10    11    12    13    14    15    B    17    18    19

