

# Methotrexateのin vitro及びin vivoにおけるnatural killer活性に及ぼす影響

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 半井, 孝幸 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7934">http://hdl.handle.net/2297/7934</a>

## Methotrexate の in vitro 及び in vivo における natural killer 活性に及ぼす影響

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

半 井 孝 幸

(昭和62年2月13日受付)

Methotrexate (MTX) の in vitro 及び in vivo natural killer (NK) 活性に及ぼす影響を検討した。正常成人より末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMNCs) を分離し, recombinant interleukin 2 (rIL 2) (25 U/ml) と 48 時間培養後, 種々の濃度 ( $10^{-10}$  M ~  $10^{-6}$  M) の MTX を加え, 更に 24 時間培養後 K562 細胞を標的細胞として, 4 時間  $^{51}\text{Cr}$  release 法によって NK 活性を測定した。MTX を  $10^{-8}$  M 添加した時に, NK 活性は最も有意に増強された。PBMNCs を羊赤血球でロゼットを形成させ, T 細胞及び non-T 細胞に分離し, 前記と同様に培養し両者の NK 活性を測定した所, T 細胞分画では MTX ( $10^{-8}$  M) 添加群の NK 活性は, 非添加群と比較して有意に増加したが, non-T 細胞分画では有意差は認められなかった。更に T 細胞を同様に培養後, 単クローン抗体 Leu-7, OK-NK (Leu-11) と補体で処理し, effector cell level で検討したが, Leu-11 と補体処理により NK 活性は著明に減少し, MTX による増強効果も消失した。以上より MTX による NK 活性増強には  $\text{E}^+$  Leu-11 $^+$  細胞が関与していることがわかった。又, HL-60 細胞を標的細胞として lymphokine-activated killer 活性を測定したが, MTX による活性の増強は認められなかった。次に 11 名の寛解期のリンパ球性白血病及び non-Hodgkin リンパ腫の患児に施行した大量 MTX 療法 (2000 mg/m<sup>2</sup>) 前後における NK 活性, リンパ球サブセットの変化を検索した。MTX 投与終了直後, 血中濃度は  $10^{-5}$  M ~  $3 \times 10^{-4}$  M まで上昇し, NK 活性は治療前よりも減少していた。しかし Leu-7 $^+$  及び Leu-11 $^+$  細胞の割合は相対的に増加しており, MTX に耐性であることが示唆された。以上の成績より, NK 活性などの生体免疫監視機構に及ぼす MTX の影響を調べることは重要であると考えられた。

---

**Key words** methotrexate, interleukin 2, natural killer, lymphokine-activated killer, high-dose methotrexate therapy, malignancy

---

小児科領域における悪性腫瘍の中では, 白血病・悪性リンパ腫が最も多く, その治療のために各種抗癌剤が使用されている。一方, natural killer (NK) 細胞とは, 抗原感作を必要とせず, major histocompatibility complex (MHC) に拘束されずに, ある種の腫瘍細胞に傷害活性を示す細胞であり, 近年生体内における腫瘍<sup>1)</sup>やウイルス感染<sup>2)</sup>に対する免疫監視機構の一翼を担っていると考えられている。又, lymphokine-activated killer (LAK) 細胞とは,

Grimm ら<sup>3)</sup>によって提唱され, recombinant interleukin 2 (rIL 2) 存在下で3日間培養することにより, 自己の固型腫瘍も含めたNK細胞抵抗性の各種腫瘍細胞を傷害するような細胞集団であり, 最近では adoptive immunotherapy<sup>4)</sup>として臨床にも応用されるようになった。このような状況から, 各種抗癌剤のNK及びLAK活性に及ぼす影響を検討することは重要であり, すでに幾つかの報告もみられる<sup>5)~9)</sup>。Matheson らは in vitro におけるNK活性がmetho-

---

Abbreviations: FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; LAK, lymphokine-activated killer; MTX, methotrexate; NK, natural killer; PBMNCs, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; rIL 2, recombinant interleukin 2; rIFN- $\gamma$ , recombinant interferon- $\gamma$ ; SRBCs, sheep red blood cells

trexate (MTX) により増強された事を報告している<sup>10)11)</sup>。MTXは悪性血液疾患に対する抗癌剤として広範に使用されている薬剤の一つであり、leucovorin (folinic acid) rescue 療法導入により、大量 MTX 療法が可能となった。本研究では、in vitro において、正常成人末梢単核球を用いて、MTX の NK 及び LAK 活性に及ぼす影響を検討するとともに、完全寛解期の白血病及び悪性リンパ腫患児に施行した大量 MTX 療法前後における NK 細胞の変化、即ち in vivo NK 活性に及ぼす影響を検討した。近年、NK 細胞の表面マーカーに関する研究<sup>12)~14)</sup>はかなり進み、NK 細胞の heterogeneity<sup>15)</sup>が明らかにされ、LAK 細胞との異同<sup>16)~18)</sup>なども議論されている。しかし幾つかの NK subsets とその機能的側面との関連はまだ充分明らかにされていない。本研究では、NK 細胞の heterogeneity と MTX に対する反応性の相違についても検討した。

#### 対象および方法

##### 1. in vitro における MTX の NK 活性に及ぼす影響について

###### 1. 末梢単核球の分離

健康な成年男子 (年齢 24~36 才) より末梢静脈血をヘパリン採血後、Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nyegaard, Oslo, Norway) (比重 1.077) 比重遠心法 (400×g, 30 分) により単核球を分離した。単核球は phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) で 2 回洗浄後 10% 非働化 fetal bovine serum (FBS, GIBCO, Grand Island, NY) 含有 RPMI1640 (GIBCO) 培養液 (10% FBS/RPMI1640) に浮遊させた。次いで細胞 (5×10<sup>6</sup>/ml) を直径 6 cm のプラスチックシャーレ (Falcon, Oxnard, CA) に撒布し、37°C、5% CO<sub>2</sub>、湿潤下で 2 時間静置後、非付着単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMNCs) を得、200×g、5 分間遠心後上清を捨て、再び 10% FBS/RPMI1640 に浮遊させた。

###### 2. T 及び non-T 細胞の分離

neuraminidase (Behringwerke AG, Marburg, W. Germany) 処理羊赤血球 (sheep red blood cells, SRBCs, 日本生物材料センター, 東京) を 2×10<sup>8</sup>/ml に調整し、1×10<sup>7</sup>/ml に調整した PBMNCs、及び SRBCs 吸収 FBS と、各々同容量混合した。200×g、5 分間遠心後、4°C で 30 分間静置しロゼットを形成させ、Ficoll-Hypaque 比重遠心法によりロゼット形成細胞とロゼット非形成細胞に分離した。残存する SRBCs は 0.83% トリス緩衝塩化アンモニウム溶液 (pH 7.3) で 5 分間溶血させ、両分画とも PBS で 2 回

洗浄した。その後 10% FBS/RPMI1640 に浮遊させ、ロゼット形成細胞分画を T 細胞分画 (E<sup>+</sup>)、ロゼット非形成細胞分画を non-T 細胞分画 (E<sup>-</sup>) とした。

##### 3. Effector 細胞の処理

純化された MTX (Dr. B. Chabner, NIH より恵与) を RPMI1640 で種々の濃度に希釈し (最終濃度 10<sup>-11</sup> M~10<sup>-6</sup> M)、PBMNCs, T 細胞, non-T 細胞浮遊液に添加した (最終濃度 2×10<sup>6</sup>/ml)。又上記の系に rIL 2 (武田製薬, 大阪) 或いは recombinant interferon- $\gamma$  (rIFN- $\gamma$ ) (協和発酵, 東京) を各種濃度・時間的経過で添加した。

##### 4. NK 活性及び LAK 活性の測定

NK 活性の標的 (target) 細胞として、ヒト赤白血病細胞由来株である K562 細胞を <sup>51</sup>Cr (Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>, 1 mCi/ml, New England Nuclear, Boston, MA) でラベル後、1×10<sup>6</sup>/ml に調整して使用した。effector 細胞, target 細胞を各々 0.1 ml (E:T=20:1) を 96 穴丸底型マイクロプレート (Falcon) に triplicate で分注し、200×g、5 分間遠心後、37°C 5% CO<sub>2</sub> 湿潤下で 4 時間培養した。その後上清を各穴から 0.1 ml 採取し、<sup>51</sup>Cr 放出量を auto well gamma counter ARC-501 (アロカ, 東京) にて測定した。% cytotoxicity を下記の式より求め NK 活性の指標とした。% cytotoxicity = {cpm (experimental) - cpm (spontaneous) / cpm (maximum) - cpm (spontaneous)} × 100 : maximum release は target 細胞に 1% Triton X を加えた際の <sup>51</sup>Cr 放出量を示し、spontaneous release は培養液のみを加えた際の target 細胞の <sup>51</sup>Cr 自然放出量である。LAK 活性は target 細胞として NK 耐性細胞である前骨髄性白血病由来株の HL-60 細胞を用い、上記と同様の方法で測定した。

##### 5. アガロース単一細胞傷害試験<sup>19)</sup>

effector 細胞と target 細胞を同数混合し (各々 2×10<sup>6</sup>/ml の濃度で 0.1 ml)、150×g で 5 分間遠心後、37°C 5% CO<sub>2</sub> 湿潤下で 10 分間静置した。その後上清を捨て、細胞ペレットをパスツールピペットを用いて注意深く攪拌し、0.5% アガロース RPMI1640 ゲルを 40°C に保温し加えた。細胞をスライドグラス上に移し、target 細胞に結合している effector 細胞の相対的割合を百分率で求めた。

##### 6. リンパ球サブセットの測定

unfractionated, T 及び non-T 細胞分画内のリンパ球サブセットを下記の fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識単クローン抗体を用いた直接及び間接免疫蛍光法で解析した。単クローン抗体は OKT3 (CD3, pan T), OKT11 (CD2, SRBC receptor), OKM1 (CD11, C3bi receptor)、(以上 Ortho Diagnostic

System Inc. Westwood, MA) 及び, Leu-7, Leu-11a (CD16, Fc receptor), HLA-DR (Ia) (以上 Becton-Dickinson, Mountain View, CA) を使用した。各細胞浮遊液 ( $2 \times 10^6$ /ml) 0.1 ml に各種単クローン抗体を 2~5  $\mu$ l 加え, 4°C 30 分静置後 PBS で 1 回洗浄後, 蛍光陽性細胞をレーザーフローサイトメーター Ortho Spectrum III (Ortho Diagnostic System) を用いて測定した。

7. 単クローン抗体と補体を用いた補体依存性細胞傷害によるリンパ球亜群の除去

単クローン抗体は, 補体結合性を有している Leu-7 及び OK-NK (Leu-11b) (CD16) (Ortho Diagnostic System) を使用した。  $1 \times 10^7$ /ml に調整したリンパ球浮遊液に単クローン抗体を 1/200 の割合に加え, 4°C 30 分間静置した後, RPMI1640 で 2 回洗浄し, 新鮮家兎血清を細胞浮遊液の 1/4 の割合に加え, 更に 37°C 1 時間反応させた。再び RPMI1640 で 2 回洗浄後, 0.2% トリパンブルー除去法により生細胞を算出し, 10% FBS/RPMI1640 に  $2 \times 10^6$ /ml の濃度で浮遊させた。

## II. In vivo における MTX の NK 活性に及ぼす影響について

### 1. 対象

金沢大学小児科に入院したリンパ球性白血病及び non-Hodgkin リンパ腫の患児 11 名 (年齢 1~15 才, 性別男 7, 女 4) で, 何れも血液学的に完全寛解中であり, 維持療法の一つとして MTX 大量療法 (2000 mg/m<sup>2</sup>) を施行した症例を対象とした。MTX は一定のプロトコールに従い, 充分な利尿後 2000 mg/m<sup>2</sup> を 2400 ml/m<sup>2</sup> のソリタ T<sub>3</sub> 500 ml メイロン 20 ml 混液に溶解し, 24 時間で点滴静注した。静注終了後 12 時間後より, leucovorin 30 mg/m<sup>2</sup> を 6 時間毎に 7 回静注した。末梢血は MTX 治療前, 24 時間点滴静注終了時及び終了 48 時間後に採取し, 単核球を分離した。コントロールとして, 同時間に同一成人 1 名 (著者) より末梢血を採取した。

### 2. 末梢血単核球分離及び NK 活性測定

前記と同様に PBMNCs を分離した後, effector 細胞として調整し, NK 活性の変化の指標として, % of control を下記の式より求めた。

$$\% \text{ of control} = \{ \% \text{ cytotoxicity (patient)} / \% \text{ cytotoxicity (control)} \} \times 100$$

### 3. MTX 治療前後における細胞表面マーカーの変化

MTX 治療中の患児末梢白血球数は Thoma 計算板を用いて算定し, 末梢血リンパ球数は血液塗布染色標本を作製し, 白血球百分率より算出した。細胞表面マーカーの検索は FITC 標識 Leu-7, Leu-11a, OKT11 単

クローン抗体を用いた直接免疫蛍光法によった。末梢リンパ球数に抗原陽性細胞の割合を乗ずることにより, 抗原陽性細胞の絶対数を算出した。一症例につき, Phycoerythrin (PE) で標識した OKT11 と, FITC 標識 Leu-11a を用い, Spectrum III 及び DS-1 program (Ortho Diagnostic System) にて両抗原共有細胞を解析した。

## III. 統計的処理

NK 及び LAK 細胞活性についての比較検討に際して, Student t-test もしくは paired t-test を用い, 危険率 5% 以下を有意差ありと判定した。

## 成 績

### I. MTX 単独の in vitro NK 活性に及ぼす影響

PBMNCs を各種濃度の MTX とともに 48 時間培養後 NK 活性を測定した (図 1)。尚, NK 活性測定の際, MTX は除去されていないので, 各種濃度の MTX のみを加えた spontaneous release も同時に測定し, 培養液のみ spontaneous release と各々比較検討した。有意差はなく, 以後の実験は MTX を除去せずに行った。MTX 添加により NK 活性は多少増強するものの, 有意差は認められなかった。培養液に FBS を加えない場合も同様な結果であった。又, 培養時間を 6~72 時間と変化させたが, やはり同様な結果で有意差

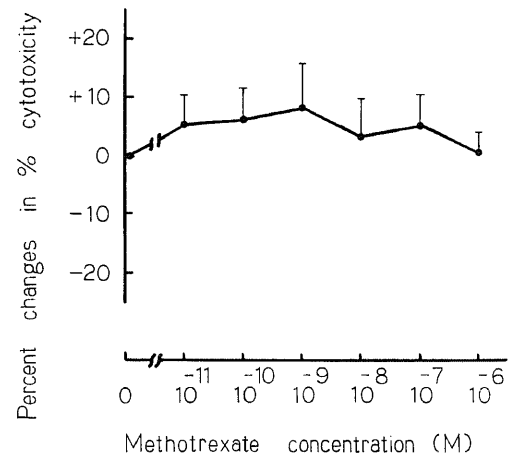


Fig. 1. Effect of MTX on NK cell activity. PBMNCs were incubated with MTX at various concentrations for 48 hrs at 37°C prior to addition of the target cells. The data are expressed as the percent change in the NK activity in the presence of the drug compared to the NK activity in the absence of the drug. The data represent mean  $\pm$  S.D. of six experiments. The control value of % cytotoxicity without drug ranged 23 to 43 %.

はなかった。

II. rIL 2 で活性化された NK 細胞に及ぼす MTX の影響

PBMNCs に各種濃度の MTX 及び rIL 2 (25 U/ml) を同時に添加し、48 時間培養した (図 2a)。比較的低濃度の MTX ( $10^{-11}$  M $\sim$  $10^{-8}$  M) 添加により NK 活性は増強されたが、有意差はなかった。図 2b は PBMNCs を rIL 2 (25 U/ml) と 48 時間培養し、各種濃度の MTX を加え、更に 24 時間培養後、NK 活性を

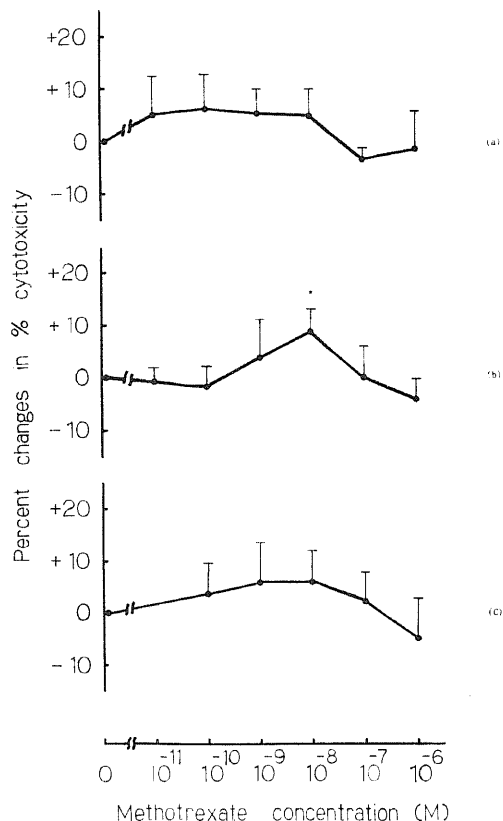


Fig. 2. Effect of MTX on rIL 2-activated NK cell activity.

a) PBMNCs were incubated with rIL2 (25 U/ml) and MTX at various concentrations for 48 hrs. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of four experiments.

b) PBMNCs were incubated with rIL2 (25 U/ml) for 72 hrs. In the last 24 hrs. MTX at various concentrations were added. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of eight experiments. \*,  $p < 0.05$  as compared with control group without MTX (Student t-test).

c) PBMNCs were incubated with MTX at various concentrations for 72 hrs. In the last 24 hrs. rIL 2 (25 U/ml) was added. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of three experiments.

測定した成績である。MTX が  $10^{-8}$  M の時 NK 活性は、対照を 100 とすると  $108.2 \pm 6.1$  ( $p < 0.05$ ) と有意に増強した。rIL 2 と MTX の添加の順序を逆にし、PBMNCs を先に各種濃度の MTX と 48 時間培養後、rIL 2 (25 U/ml) を添加した場合 (図 2c) は、やはり低濃度 ( $10^{-11}$  M $\sim$  $10^{-7}$  M) で NK 活性の増強を認め

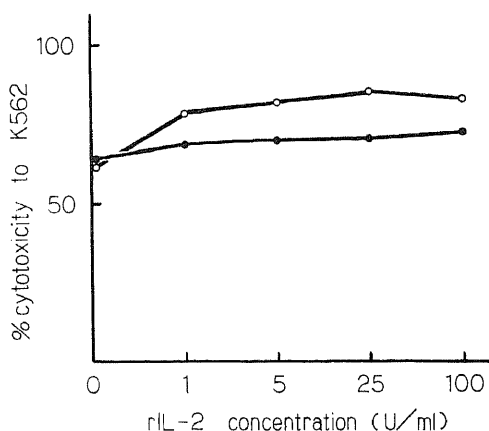


Fig. 3. Effect of rIL 2 on NK cell activity.

PBMNCs were incubated for 72 hrs with rIL 2 at various concentrations (0 to 100 U/ml). MTX ( $10^{-8}$  M) ( $\circ-\circ$ ) was added in the last 24 hrs. Data from one of two similar experiments are presented.  $\bullet-\bullet$ , control without MTX.

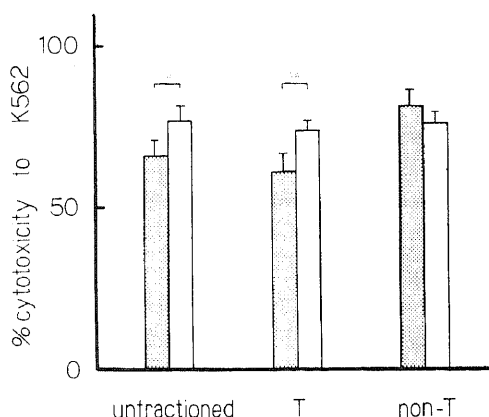


Fig. 4. Effect of MTX on rIL 2-activated NK cell activity in unfractionated, T and non-T cell subpopulations.

Each cell subpopulation was incubated with rIL 2 (25 U/ml) for 72 hrs. In the last 24 hrs. MTX ( $10^{-8}$  M) ( $\square$ ) was added. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of experiments. Paired t-test was used to determine the significant differences between control and experimental groups. \*,  $p < 0.005$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ;  $\square$ , control without MTX.

たが、統計学的有意差はなかった。以上の結果より、以後の実験ではPBMCsをrIL 2と48時間培養後、MTX ( $10^{-8}$  M)を加え、更に24時間培養し、NK活性を測定することにした。

### III. rIL 2の至適濃度

図3はrIL 2添加濃度とNK活性の関係を示す。MTX ( $10^{-8}$  M)添加群では、rIL 2 (25 U/ml)の濃度を添加した場合にNK活性の上昇がみられ、かつMTX無添加の場合と比べてNK活性の増強が極値となったので、以後の実験では25 U/mlをrIL 2の至適濃度とした。尚、rIL 2無添加の場合でもNK活性は62~65%程度認められるが、おそらくFBSによるNK活性の増強と考えられた。

### IV. NK細胞のprecursor cell levelでの検討

NK細胞の前駆細胞の性状を検討するため、PBMCsを予め、unfractionated (非分画)、T及びnon-T細胞に分画し、各々rIL 2 (25 U/ml)と48時間培養し、MTX ( $10^{-8}$  M)を加え更に24時間培養後NK活性を比較検討した。図4のごとく、非分画及びT細胞ではMTX添加により活性の増強を認め、% cytotoxicityは、非分画細胞：MTX添加群  $76.5 \pm 3.9\%$ 、非添加群  $65.6 \pm 4.3\%$  ( $p < 0.005$ )、T細胞：MTX添加群  $73.3 \pm 3.0\%$ 、非添加群  $60.2 \pm 4.5\%$

( $p < 0.01$ )と有意差を認めた。しかし、non-T細胞ではMTX添加群  $76.1 \pm 2.1\%$ 、非添加群  $80.4 \pm 4.2\%$ と両者間に有意差はなかった。T及びnon-T細胞の分画時、両者の絶対数はおおよそ3~4:1であった。この結果より、rIL 2, MTX添加によるNK活性の増強は主にT細胞分画によると考えられた。

### V. リンパ球サブセットの変化

rIL 2, MTX添加によるリンパ球サブセットの変化を検討したが、表1に示すように、添加前と比較して顕著なサブセットの変化は認められなかったものの、non-T細胞分画中のOKT11, Leu-7抗原陽性細胞の軽度の増加と、T細胞分画中のLeu-11a抗原陽性細胞の軽度の減少を認めた。Leu-11a陽性細胞はT細胞分画で13.1%、non-T細胞分画で38.8%であり、non-T細胞のNK活性の方が、T細胞より高値(図4)であることの説明となろう。更に図5に示すようにT細胞を前記と同様に培養した後、E/T比を5/1~20/1と変化した場合のNK活性を測定したところ、いずれの条件でもMTX ( $10^{-8}$  M)添加によるNK活性の増強が確認された。

### VI. アガロース単一細胞傷害試験

effector細胞とtarget細胞の結合状態を観察するためアガロース単一細胞傷害試験を実施した。表2に

Table 1. Surface marker analysis of T and non-T cell subsets before and after treatment with rIL 2 and MTX

	Before treatment (%)	After rIL 2 treatment and	
		medium alone (%)	MTX $10^{-8}$ M (%)
T cells			
OKT 3	80.9	80.8	80.6
OKT11	92.8	96.5	95.6
Leu-7	19.0	15.5	15.8
Leu-11	13.1	9.8	9.8
OKM 1	24.4	15.2	14.7
HLA-DR	10.3	9.3	9.5
non-T cells			
OKT 3	14.5	14.6	14.9
OKT11	20.4	29.1	27.0
Leu-7	23.4	30.6	30.6
Leu-11	38.8	37.9	36.4
OKM	42.5	37.8	39.9
HLA-DR	33.5	—	—

T and non-T cells were incubated with rIL 2(25U/ml) for 72hrs and in the last 24 hrs, MTX ( $10^{-8}$ M) was added. Surface markers of lymphocyte subsets were determined by a direct or indirect immunofluorescence method as described in Materials and Methods. Data from one of 2 similar experiments are presented. The ratio of T cells to non-T cells are about 3-4.

示すように、MTX 添加による binding ability の増加は認められなかった。

#### VII. NK 細胞の effector cell level での検討

T 細胞を前記と同様に培養した後、Leu-7, OK-NK (Leu-11b) 抗体と補体を用いて、同抗原陽性細胞を除去した後の NK 活性を測定することにより、NK 活性発現における effector 細胞としての性状を検討した (図 6)。処理後の同抗原陽性細胞の割合は、いずれも 3% 以下であった。OK-NK (Leu-11b) と補体処理により NK 活性は著明に低下し、MTX による増強も消失した。一方 Leu-7 と補体処理では活性の一部低下が認められるのみであった。表 1 より、rIL 2, MTX 処理後の T 細胞分画中の OKT11 の割合は 95.6% とその大部分を占めていることより、MTX による NK 活性の増強には effector cell level では  $E^+ Leu-11^+$  (おそらく  $OKT11^+ Leu-11^+$ ) 細胞が関与していると考えられた。

#### VIII. LAK 活性に対する MTX の影響

unfractionated, T 及び non-T 細胞を前記と同様に培養し、HL-60 細胞を target 細胞として、LAK 活性を測定した (図 7)。全般的に活性が低かったが、MTX 添加による LAK 活性の増強は認められなかった。

#### IX. rIFN- $\gamma$ の影響 (図 8)

PBMCs を各種濃度の rIFN- $\gamma$  と MTX ( $10^{-8}$  M) とともに 48 時間培養後、NK 活性を測定した。NK 活性は濃度依存的に上昇したが、MTX 添加による活性の増強は認められなかった。

#### X. 小児悪性血液疾患患児における MTX 大量療法前後の NK 細胞及び NK 活性の変化

MTX 点滴静注終了後の MTX 血中濃度は  $10^{-5}$  M  $\sim$   $3 \times 10^{-4}$  M まで上昇し、終了 48 時間後では  $10^{-8}$  M  $\sim$   $10^{-7}$  M まで低下した (TDX システム, ダイナボット, 東京により測定)。表 3a に示されるように、MTX 投与後の Leu-7 $^+$  或いは Leu-11 $^+$  細胞の相対的割合は、治療前に比べて増加する場合が多かった。それにもかかわらず、NK 活性は大部分の症例で同等か軽度

の低下を認めた。表 3b は治療前に対する治療後の Leu-7 $^+$  或いは Leu-11 $^+$  細胞の絶対数及び NK 活性の割合を算出し、まとめたものである。表に示すように、絶対数についても同等か軽度増加するものが幾つか認められたが、有意差はなかった。又、一症例 (G.M.) について、治療前及び直後に、PE で標識した OKT11, FITC 標識 Leu-11a を用いて二重染色を行った。治療前では Leu-11 $^+$  細胞中の OKT11 $^+$  細胞は 81.8%, OKT11 $^-$  細胞は 19.2% であり、治療直後で Leu-11 $^+$  細胞中の OKT11 $^+$  細胞は 82.7%, OKT11 $^-$  細胞は 17.3% であった。従って MTX による NK 活性増強作用に関与していると思われる Leu-11 $^+$  OKT11 $^+$  細胞の割合は有意の変動を示さなかった。

#### 考 察

MTX の NK 活性に及ぼす影響については幾つか

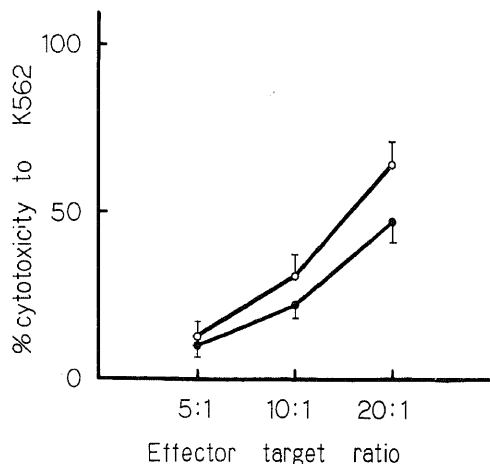


Fig. 5. Effect of MTX on rIL 2-activated NK cell activity in T cells at various E:T ratios.

T cells were incubated with rIL 2 (25 U/ml) for 72 hrs. In the last 24 hrs, MTX ( $10^{-8}$  M) (○—○) was added. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of three experiments. ●—●, control without MTX.

Table 2. Ability of T cells to bind to K562 target cells

	T cells treated with	
	medium alone	MTX $10^{-8}$ M
Conjugate formation	11.0% $\pm$ 3.4%	12.2% $\pm$ 2.7%

T cells were treated with rIL 2(25U/ml) for 72hrs and in the last 24hrs, MTX ( $10^{-8}$  M) was added. Binding ability of T cells to K562 target cells were assessed by an agarose single cell assay as described in Materials and Methods. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of 3 separate experiments.

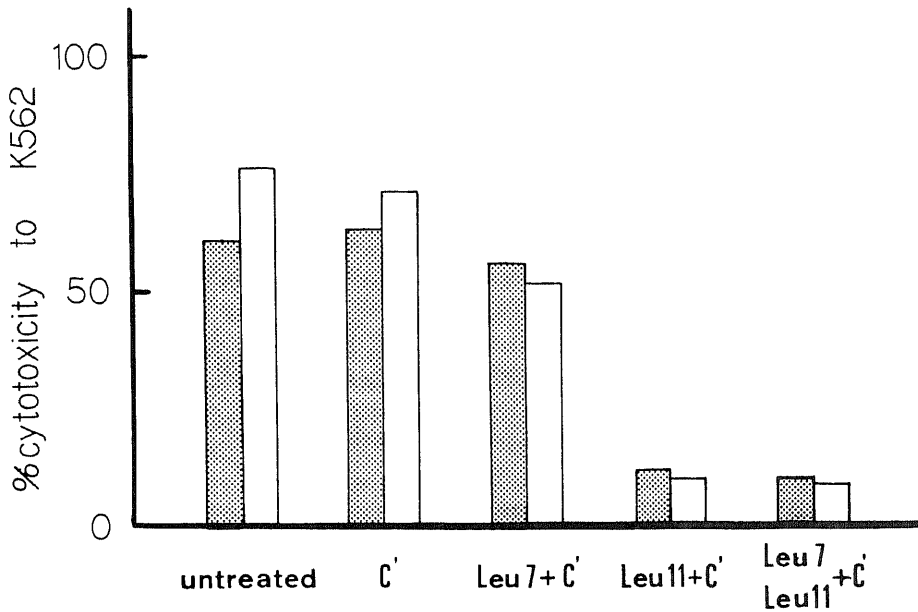


Fig. 6. Changes in NK cell activity of rIL 2-activated T cells after treatment with monoclonal antibodies and complement.

T cells were incubated with rIL 2 (25 U/ml) for 72 hrs. In the last 24 hrs. MTX ( $10^{-8}$  M) (□) was added. And cells were treated with Leu-7 and/or Leu-11 monoclonal antibodies plus complement. After treatment, the number of cells were recounted and NK assay was carried out at the E:T ratio of 20:1. Data from one of two similar experiments are presented. ▨, control without MTX.

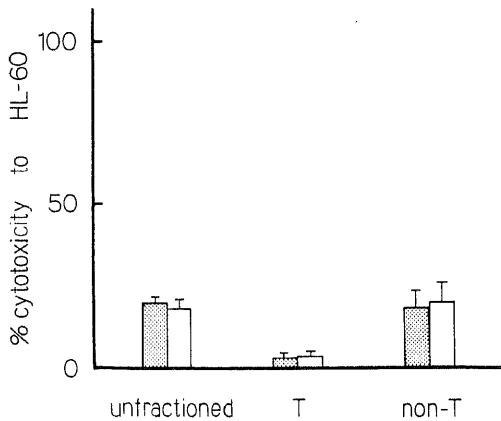


Fig. 7. Effect of MTX on LAK activity of un-fractionated, T and non-T cell subpopulations.

Each cell subpopulations was incubated with rIL 2 (25 U/ml) for 72 hrs. In the last 24 hrs, MTX ( $10^{-8}$  M) (□) was added and LAK assay was carried out by using HL-60 target cells. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three experiments. ▨, control without MTX.

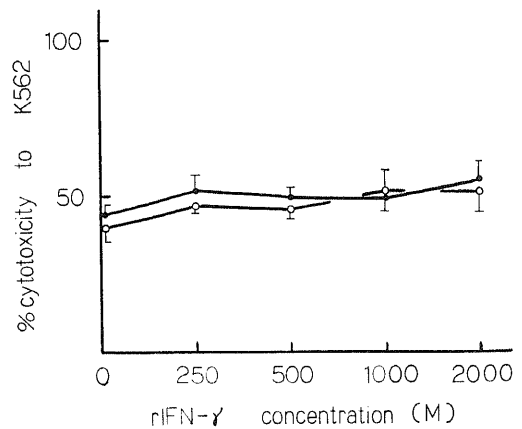


Fig. 8. Effect of rIFN- $\gamma$  on NK cell activity.

PBMCs were incubated for 48 hrs with MTX ( $10^{-8}$  M) (○) and rIFN- $\gamma$  at various concentrations (0 to 2000 U/ml). The data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of three experiments. ●, control without MTX.



Table 3. Changes of NK cell population and NK activity during high dose-MTX therapy  
(a) The absolute number of Leu7<sup>+</sup> and Leu11<sup>+</sup> cells, and NK activity

Pat.	Before HD-MTX therapy				0hr after HD-MTX therapy				48hr after HD-MTX therapy			
	WBC (/mm <sup>3</sup> )	No. (%) of lymphocytes (/mm <sup>3</sup> )	No.(%) of Leu7 <sup>+</sup> and Leu11 <sup>+</sup> cells (/mm <sup>3</sup> ) (%)	NK activity % of control	WBC (/mm <sup>3</sup> )	No. (%) of lymphocytes (/mm <sup>3</sup> )	No.(%) of Leu7 <sup>+</sup> and Leu11 <sup>+</sup> cells (/mm <sup>3</sup> ) (%)	NK activity % of control	WBC (/mm <sup>3</sup> )	No. (%) of lymphocytes (/mm <sup>3</sup> )	No.(%) of Leu7 <sup>+</sup> and Leu11 <sup>+</sup> cells (/mm <sup>3</sup> ) (%)	NK activity % of control
1.M.K.	2600	650(25%)	Leu 7 163(25.1%) Leu11 24( 3.7%)	21.3%	1700	612(36%)	Leu 7 127(20.7%) Leu11 32( 5.5%)	30.6%	1100	737(67%)	Leu 7 361(49.1%) Leu11 34( 4.7%)	31.3%
2.A.T.	3500	1365(39%)	Leu 7 538(39.4%) Leu11 602(44.1%)	71.8%	3200	960(30%)	Leu 7 217(22.6%) Leu11 256(26.7%)	60.7%	2900	580(20%)	Leu 7 217(21.2%) Leu11 170(29.3%)	53.3%
3.H.M.	5600	2350(42%)	Leu 7 143( 6.1%) Leu11 691(29.4%)	98.0%	4900	1668(34%)	Leu 7 122( 7.3%) Leu11 680(40.8%)	121.7%	3900	1248(32%)	Leu 7 39( 3.1%) Leu11 388(31.1%)	74.8%
4.Y.N.	2500	1200(48%)	Leu 7 475(39.6%) Leu11 254(21.2%)	88.1%	2100	798(38%)	Leu 7 273(34.2%) Leu11 —	49.7%	2100	735(35%)	Leu 7 445(60.6%) Leu11 189(25.7%)	46.4%
5.N.A.	2300	943(41%)	Leu 7 110(11.7%) Leu11 204(21.6%)	89.0%	2900	783(27%)	Leu 7 128(16.3%) Leu11 229(29.3%)	—	1800	360(20%)	Leu 7 123(34.2%) Leu11 269(74.7%)	81.2%
6.G.M.	3900	1053(27%)	Leu 7 217(20.6%) Leu11 85( 8.1%)	49.7%	3500	1085(31%)	Leu 7 315(29.0%) Leu11 202(18.6%)	55.5%	2300	805(35%)	Leu 7 309(38.4%) Leu11 212(26.3%)	—
7.N.H.	5900	2065(35%)	Leu 7 376(18.2%) Leu11 293(14.2%)	67.0%	4100	1598(39%)	Leu 7 726(45.4%) Leu11 550(34.4%)	58.2%	3500	1085(31%)	Leu 7 666(61.4%) Leu11 345(31.8%)	—
8.M.T.	3900	1755(45%)	Leu 7 372(21.2%) Leu11 47( 2.7%)	—	2900	1421(49%)	Leu 7 419(29.5%) Leu11 261(18.4%)	—	1900	380(20%)	Leu 7 46(12.0%) Leu11 174(45.8%)	53.3%
9.N.F.	5500	715(13%)	Leu 7 39( 5.4%) Leu11 427(59.7%)	120.7%	2400	648(27%)	Leu 7 13( 2.0%) Leu11 279(43.1%)	37.4%	3200	608(19%)	Leu 7 85(13.9%) Leu11 186(30.6%)	30.1%
10.E.Y.	2600	884(34%)	Leu 7 122(13.8%) Leu11 93(10.5%)	53.0%	4100	738(18%)	Leu 7 75(10.1%) Leu11 157(31.3%)	60.9%	1300	416(32%)	Leu 7 96(23.1%) Leu11 117(28.1%)	45.5%
11.T.N.	2700	1215(45%)	Leu 7 180(14.8%) Leu11 230(18.9%)	89.3%	2400	864(36%)	Leu 7 342(39.6%) Leu11 431(49.9%)	84.9%				

The absolute number of Leu7<sup>+</sup> or Leu11<sup>+</sup> cells was calculated by multiplying the relative proportion of Leu7<sup>+</sup> or Leu11<sup>+</sup> cells by the total number of lymphocytes. NK activity was calculated as follows: % of control = [% cytotoxicity (patient)/% cytotoxicity (control)] × 100. NK activities (% cytotoxicity) of the control PBMCs from a normal volunteer were ranged 23.4% to 57.1% through these experiments. Patient 1-8 were diagnosed as acute lymphoblastic leukemia and patient 9-11 as non-Hodgkin lymphoma.

の報告があり<sup>51)10)11)</sup>, Mathesonらは、MTXによりNK活性は増強したと報告している。彼らの成績では $10^{-9}$  M $\sim$  $10^{-8}$  MのMTX単独添加でNK活性の増強が認められたとしたが、著者の成績ではMTX単独添加によるNK活性の増強は認められなかった。この相違に対する説明として、彼らは18時間<sup>51</sup>Cr release法でNK活性を測定し、lytic unitsをNK活性の指標としているのに対して、著者は4時間<sup>51</sup>Cr release法を用い、% cytotoxicity (E:T=20:1のみ)をNK活性の指標にするという、手技的及び統計学的処理法の違いによるか、或いは培養液組成の違い(彼らはMEM-alpha単独であるのに対して、著者は10% FBS/RPMI1640かRPMI1640単独)によることが可能性として挙げられる。しかし、今回の著者の成績では、rIL 2で48時間培養後MTX ( $10^{-8}$  M)を添加することにより、NK活性の有意の増強が認められた。これは、rIL 2で活性化され細胞内代謝が亢進している状態になり、MTXの影響がより顕著に現われたものと考えられた。

近年、NK細胞やLAK細胞に関する知見が数多く報告され、それにつれNK細胞は単一の細胞集団ではなく、その表面形質、細胞傷害活性能、リンフォカインに対する反応性などにおいてheterogeneity<sup>15)</sup>が存在することがわかった。又、そのcell lineage<sup>23)</sup>やLAK細胞との異同<sup>16)~18)</sup>についても議論のある所となっている。NK細胞の表面マーカーに関しても詳細な研究が進んでおり、Leu-11 (CD16)<sup>24)</sup>、Leu-7 (HNK-1)<sup>24)</sup>、Leu-19 (NKH-1)<sup>13)14)</sup>、OKM1 (CD11)<sup>25)</sup>、OKT11 (CD2)<sup>26)27)</sup>、OKT8 (CD8)などが挙げられる。しかし、LAK細胞のprecursor及びeffector細胞の表面マーカーに関しては諸説がある。Lanierら<sup>13)28)</sup>は、LAK細胞のprecursorの大部分はLeu-19<sup>+</sup> CD5<sup>-</sup> (その90%以上はCD16<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>)のNK細胞であり、rIL 2存在下

に培養してもそのマーカーは変化せず、effectorとなったと報告している。Itohら<sup>29)30)</sup>もほぼ同様な結果で、CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> Leu-7<sup>-</sup>がLAK細胞のprecursorの大部分を占め、effectorはCD16<sup>+</sup> Leu-7<sup>+</sup>であったと報告している。又、Schmidtら<sup>14)</sup>やOrtaldら<sup>31)</sup>も同様な結果であった。しかし、いずれもEロゼットレセプターであるOKT11 (CD2)については言及していない。Grimmら<sup>31)</sup>はLAK細胞のprecursorはE<sup>-</sup>、CD3<sup>-</sup>、Leu-7<sup>-</sup>、OKM1<sup>-</sup>のnon-T、non-B lymphocytesであったとしている。一方Damleら<sup>32)</sup>はLAK細胞のprecursorは多種多様で、CD16<sup>+</sup>だけでなく、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD20 (B1)<sup>+</sup>細胞などにも存在していたと報告している。NK細胞におけるOKT11<sup>+</sup>細胞の割合は約50% $\sim$ 80%<sup>26)27)</sup>といわれているが、OKT 11抗原の有無による機能的な差異に関する報告は、著者の知るかぎりではなされていない。今回の著者の成績では、rIL 2及びMTX添加によってE<sup>+</sup>細胞のNK活性が増強されたにもかかわらず、E<sup>-</sup>細胞の活性は増強されなかった。しかもOK-NK (Leu-11)と補体処理によりNK活性が著減し、MTXによる増強効果も消失したことから、この現象にはE<sup>+</sup> Leu-11<sup>+</sup>細胞が強く関与していることが示唆された。この結果はEロゼットレセプター (OKT11抗原)の有無により、NK細胞の機能の相違が存在することを示している。近年、Lanierら<sup>12)</sup>により、NK細胞のごく一部にCD3<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>のsubpopulationが存在し、rIL 2添加により弱いながらも、NK活性の増強とLAK活性を示すことが報告されている。このsubpopulationの大部分はOKT11 (CD2)陽性であり、MTX添加による傷害活性の増強に関係しているかもしれない。

又、E<sup>+</sup>細胞はrIL 2及びMTX添加によりK562に対する傷害活性は増強されたが、HL-60に対するLAK活性は増強されなかった。このことはK562と

Table 3.

(b) The relative indexes of Leu-7<sup>+</sup> and Leu-11<sup>+</sup> cells, and NK activity

	0hr after therapy	48hrs after therapy
Leu-7	1.12 $\pm$ 0.54 (n=11)	1.04 $\pm$ 0.61 (n=10)
Leu-11	1.37 $\pm$ 0.60 (n=9)	1.11 $\pm$ 0.77 (n=9)
NK activity	0.94 $\pm$ 0.33 (n=9)	0.94 $\pm$ 0.31 (n=8)

Relative indexes of Leu-7<sup>+</sup> or Leu-11<sup>+</sup> cells of 0hr or 48hrs after therapy

$$= \frac{\text{Absolute number of Leu-7}^+ \text{ or Leu-11}^+ \text{ cells of 0hr or 48hrs after therapy}}{\text{Absolute number of Leu-7}^+ \text{ or Leu-11}^+ \text{ cells before therapy}}$$

Relative indexes of NK activities of 0hr or 48hrs after therapy

$$= \frac{\text{NK activity of 0hr or 48hrs after therapy}}{\text{NK activity before therapy}}$$

The data are expressed as the mean $\pm$ S.D.

HL-60に対する傷害活性発現のメカニズムが多少異なっていて、HL-60に対するそれは、MTXに影響を受けないことを推測させる、しかし、一般的にLAK活性値はNK活性値と比べて低く、そのために有意な差が出なかった可能性も否定できない。著者の成績では、non-T細胞のLAK活性の方がT細胞より高かったが、これは、LAKのprecursorはE<sup>-</sup>であるというGrimm<sup>31)</sup>の報告と一致する。また表1からもわかるように、non-T細胞分画中のLeu-7やLeu-11(CD16)陽性細胞の割合はT細胞分画より多く、それらがrIL2によってLAK活性を発現すれば、当然non-T細胞分画の方がLAK活性が高くなり、Lanierら<sup>12)</sup>やItohら<sup>29)</sup>の報告とも矛盾しない。

IL2はNK活性を増強させると同時にNK細胞よりIFN- $\gamma$ を放出させ、それがさらにNK活性を増強させることが知られている。従ってMTX添加によるNK活性の増強にIFN- $\gamma$ が関与しているか否か検討する必要がある<sup>34)</sup>。著者の成績ではrIFN- $\gamma$ とMTXを同時に添加してもNK活性の増強は認められなかった。又、Mathesonら<sup>11)</sup>はMTX添加によってIFN- $\gamma$ の放出が増加するか否か検討したが、IFN- $\gamma$ は検出できなかったと報告している。このことにより、MTXはIFN- $\gamma$ とともにNK細胞に作用しないことが推測された。

次に、大量MTX療法前後のNK活性及びNK細胞の変化に関して、即ち、in vivoにおけるMTXのNK活性に及ぼす影響について検討した。担癌患者、特に白血病や悪性リンパ腫の寛解期のNK活性については幾つかの報告があり<sup>35)~38)</sup>、一般的にNK活性は正常コントロールと比べて低く、おそらく抗癌剤の影響によるものと考えられている。今回の著者の成績では、治療後におけるNK細胞(Leu-7<sup>+</sup> 或いはLeu-11<sup>+</sup>細胞)の割合が増加している例が多かった(11例中8例)。このことはNK細胞が他のリンパ球subpopulationと比較して、MTXに耐性であることを示唆している。その理由として、NK細胞が静止期にあるか、或いは増殖能が低いという可能性が挙げられる。他にMTXに耐性な細胞としては幹細胞が報告されている<sup>39)</sup>。一方、NK細胞の相対的増加にもかかわらず、NK活性は治療後も同等か軽度低下を認めた。治療後のMTX血中濃度は $10^{-5}$  M $\sim$   $3 \times 10^{-4}$  Mという高濃度に達しており、NK細胞も機能的には抑制され、少なくとも治療終了後48時間後(血中濃度は $10^{-8}$  M $\sim$   $10^{-7}$  M)でも、その抑制が続いていることが明らかになった。しかし、治療2週間後のNK活性は、治療前と同程度に復していることも確認している。著者のin vitroにおける成績でも、MTX( $10^{-6}$  M)添加時に

は、無添加時と比べてNK活性は同等か低下していることが多く(図2b,  $96.0\% \pm 4.5\%$ )、高濃度のMTX( $10^{-5}$  M $\sim$   $10^{-4}$  M)添加では、NK活性は減弱すると考えられた。又、MTX添加によるNK活性の増強にLeu-11<sup>+</sup> OKT11<sup>+</sup>細胞が関与していることが示唆されたが、in vivoの大量MTX療法中におけるLeu11<sup>+</sup>細胞中のOKT11<sup>+</sup>細胞の割合は、治療前81.8%、治療後82.7%と著変なく高濃度のMTXに対してもLeu-11<sup>+</sup> NK細胞は、OKT11抗原の有無にかかわらず耐性であることが示唆された。

近年、NK活性発現の機構を幾つかの段階に分けて説明することが可能となった<sup>40)</sup>。1)effector-target細胞の結合、2)NK細胞の活性化及び細胞内顆粒の再構築、3)granule cytolysin 或いはNK cytotoxic factor(NKCF)の放出、4)target細胞へのcytolysin, NKCFの結合、5)target細胞の破壊といった段階が挙げられる。著者の成績では、effector-target細胞の結合段階では、MTX添加群と非添加群間に有意差を認めず、それ以降の段階で、MTX添加によるNK活性の増強が起こると推測された。例えばgranule cytolysin 或いはNKCF産生には、プロテインキナーゼCの活性化、それによる蛋白合成が必要といわれており<sup>41)</sup>、この段階でMTXが影響を与えている可能性が考えられる。

MTXは葉酸代謝拮抗剤であり、その主たる生化学的作用は、dihydrofolate reductaseの阻害であり、それにより、thymidine合成及びde novo purine合成が阻害され、結果的にDNA及びRNA合成の阻害が起こる。Taylorら<sup>42)</sup>は、MTX  $2 \times 10^{-8}$  M以上の濃度ではDNA合成がRNA合成より強く阻害され、 $10^{-4}$  Mの濃度になるとRNA合成も完全に阻害されたと報告している。又、 $10^{-9}$  M $\sim$   $2 \times 10^{-8}$  Mでは、細胞内のATP, TTP, GTPの量がコントロールの10% $\sim$ 15%まで減少したと報告している。Kamiskas<sup>43)</sup>も同様にMTXによる細胞内ATP, GTPの減少と、UTP, CTPの増加を報告している。このような細胞内ヌクレオチドプールのアンバランスとNK活性との関係はまだ明らかではない。しかし、NK活性の発現にはDNA合成よりも、RNAや蛋白合成がより深く関係しているという報告は幾つか見うけられる<sup>45)</sup>。Mathesonらは、MTXによるNK活性の増強には、NK細胞内のthymidineの減少が関与し、さらにmRNA合成や蛋白合成も関係していると推測している。著者の成績やMathesonらの報告では、 $10^{-9}$  M $\sim$   $10^{-8}$  M程度の低い濃度でNK活性が最も増強されたが、この濃度では、相対的なRNA合成及び蛋白合成の亢進と、細胞内ATP, GTPの減少が推測されるが、

それがNK活性増強に関連しているのではないかと考えられた。また高濃度 ( $10^{-5}$  M $\sim$  $10^{-4}$  M) ではNK活性は低下するが、この濃度ではDNA合成だけでなくRNA合成も阻害されることが推測され、これによってNK活性が低下していると考えられた。

MTXは一般的に、白血病や悪性リンパ腫の維持療法、さらに各種悪性腫瘍に対して広く使用されている。又、最近では骨髄移植後のgraft-versus-host disease (GVHD) 予防のために、単独或いはシクロスポリンと併用で用いられるようになった。従ってMTXの生体免疫監視機構に及ぼす影響について検討することは重要であり、今後更に効率の良い治療法開発の可能性に結びつくと思われる。

## 結 論

MTXのin vitro NK活性に及ぼす影響を、主に表面マーカーの違いによるNK細胞のheterogeneityという観点で検討し、NK細胞活性発現機構との関連についても推測した。又、大量MTX療法前後のin vivo NK活性に及ぼす影響も合わせて検討し、以下の結果を得た。

1. 正常成人末梢単核球に、rIL 2 (25 U/ml) とMTX ( $10^{-8}$  M) を添加して培養した時、NK活性は有意に増加し、MTX ( $10^{-6}$  M) 以上の濃度では減少した。

2. T細胞分画では、MTX ( $10^{-8}$  M) 添加群のNK活性は、非添加群と比較し有意に増加した。一方、non-T細胞分画では、添加群・非添加群との間に有意差はなかった。更にT細胞分画中のLeu-11<sup>+</sup>細胞 (E<sup>+</sup> Leu-11<sup>+</sup>) が、MTXによるNK活性増強に関与していることが明らかとなった。

4. MTX添加により、HL-60細胞に対する細胞傷害活性 (LAK活性) は増強されなかった。

5. 大量MTX療法後、血中濃度は $10^{-5}$  M $\sim$  $3 \times 10^{-4}$  Mまで上昇し、NK活性は治療前と同等か軽度減少した。しかし、Leu-7<sup>+</sup> 或いはLeu-11<sup>+</sup>細胞は相対的に増加しており、MTXに耐性であることが示唆された。又、Leu-11<sup>+</sup> OKT11<sup>+</sup>細胞とLeu-11<sup>+</sup> OKT11<sup>-</sup>細胞の割合は治療前後で変化なかった。

6. MTX添加によるNK活性増強のメカニズムとして、effector-target結合以降の段階が考えられた。

以上より、MTXのNK活性に及ぼす影響が明らかとなったが、将来各種抗癌剤と免疫療法を併用する機会も増えることが予想され、さらに詳しい検索が必要と考えられる。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った谷口昂教授に深甚なる謝意を表します。また終始、御指導、御校閲頂いた小泉晶一講師ならびに御指導頂いた関秀俊助手に厚く御礼申し上げます。さらに、試料の提供に協力頂きました教室員各位に深く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Trinchieri, G. & Perussia, B.: Human natural killer cells: Biologic and pathologic aspects. *Lab. Invest.*, **50**, 489-513 (1984).
- 2) Yasukawa, M. & Zarling, J. M.: Autologous herpes simplex virus-infected cells are lysed by human natural killer cells. *J. Immunol.*, **131**, 2011-2016 (1983).
- 3) Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z. & Rosenberg, S. A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon: Lysis of natural killer-resistant fresh tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **155**, 1823-1841 (1982).
- 4) Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, M. L., Ettinghausen, S. E., Matory, Y. L., Skibber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J. T., Seipp, C. A., Simpson, C. & Reichert, C. M.: Observation on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 to patient with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.*, **313**, 1485-1492 (1985).
- 5) Charamella, L. J., Meyer, C., Thompson, G. E. & Dimitov, N. V.: Chemotherapeutic agents and modulation of natural killer cell activity in vitro. *J. Immunopharma.*, **7**, 53-65 (1985).
- 6) Brenner, B. G., Friedman, G. & Margolese, R. G.: The relationship of clinical status and therapeutic modality to natural killer cell activity in human breast cancer. *Cancer*, **56**, 1543-1548 (1985).
- 7) Braun, D. P. & Harris, J. E.: Effect of chemotherapy on NK function in the peripheral blood of cancer patient. *Cancer Immunol. Immunother.*, **21**, 240-245 (1986).
- 8) Sharma, B. & Vaziri, N. D.: Augmentation of human natural killer cell activity by cyclophosphamide in vitro. *Cancer Res.*, **44**, 3258-3261 (1984).
- 9) Mackay, I. R., Gooddear, M. D. E., Riglar,

- C. & Penschow, J.: Effect of natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxic chemotherapy including melphalan on breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, **16**, 98-100 (1983).
- 10) Matheson, D. S., Green, B. & Hoar, D. J.: The influence of methotrexate and thymidine on the human natural killer cell function in vitro. *J. Immunol.*, **131**, 1619-1621 (1983).
- 11) Matheson, D. S., Green, B. J., Hoar, D. I., Friedman, S. J. & Inoue, M.: Agents which decrease intracellular thymidine pools cause an augmentation in human natural killer activity in vitro. *Basic Life Sci.*, **31**, 461-464 (1985).
- 12) Lanier, L. L., Kipps, T. J. & Phillips, J. H.: Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3<sup>+</sup> T lymphocyte that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen). *J. Exp. Med.*, **162**, 2089-2106 (1985).
- 13) Lanier, L. L., Le, A. M., Cicin, C. I., Loken, M. R. & Phillips, J. H.: The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.*, **136**, 4480-4486 (1986).
- 14) Schmidt, R. E., Murray, C., Daley, J. F., Schlossman, S. F. & Ritz, J.: A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype. *J. Exp. Med.*, **164**, 351-356 (1986).
- 15) Ortaldo, J. R. & Herberman, R. B.: Heterogeneity of natural killer cells. *Ann. Rev. Immunol.*, **2**, 359-394 (1984).
- 16) Rosenberg, S. A. & Lotze, M. T.: Cancer immunotherapy using interleukin 2 and interleukin 2 activated lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.*, **681-709** (1985).
- 17) Ballas, Z. K.: Lymphokine activated killer (LAK) cells. I. Differential recovery of LAK, natural killer cells, and cytotoxic T lymphocyte after a sublethal dose of cyclophosphamide. *J. Immunol.*, **137**, 2380-2384 (1986).
- 18) Andriole, G. L., Mule, J. J., Hansen, C. T., Linen, W. M. & Rosenberg, S. A.: Evidence that lymphokine-activated killer cells and natural killer cells are distinct based on an analysis of congenitally immunodeficient mice. *J. Immunol.*, **135**, 2911-2913 (1985).
- 19) Rubin, P., Pross, H. F. & Roder, J. C.: Studies of human natural killer cells. II. Analysis at the single cell level. *J. Immunol.*, **128**, 2553-2558 (1982).
- 20) Ueno, Y., Miyawaki, T., Seki, H., Matsuda, A., Taga, K., Sato, H. & Taniguchi, N.: Differential effects of recombinant human interferon- $\gamma$  and interleukin 2 on natural killer cell activity of peripheral blood in early human development. *J. Immunol.*, **135**, 180-184 (1985).
- 21) Seki, H., Ueno, Y., Taga, K., Matsuda, A., Miyawaki, T. & Taniguchi, N.: Mode of in vitro augmentation of natural killer cell activity by recombinant human interleukin 2: A comparative study of Leu11<sup>+</sup> and Leu-11<sup>-</sup> cell populations in cord blood and adult peripheral blood. *J. Immunol.*, **135**, 2351-2356 (1985).
- 22) Ortaldo, J. R., Bonnard, G. B., Kind, P. D. & Herberman, R. B.: Cytotoxicity by cultured human lymphocytes: Characteristics of effectors and specificity of cytotoxicity. *J. Immunol.*, **122**, 1489-1494 (1979).
- 23) Lanier, L. L., & Phillips, J. H.: Ontogeny of natural killer cells. *Nature*, **319**, 269-270(1986).
- 24) Lanier, L. L., Le, A. M., Phillips, J. H., Warner, N. L. & Babcock, G. F.: Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J. Immunol.*, **131**, 1789-1796 (1983).
- 25) Bakke, A. C., Gray, J. D., Abo, W., Quismorio, F. P. Jr., Lash, A., Cooper, S. M. & Horwitz, D. A.: Studies on human blood lymphocytes with iC3b (type3) complement receptors. I. Granular, Fc-IgG receptor positive and negative subsect in healthy subjects and patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, **136**, 1253-1259 (1986).
- 26) Zarling, J. M., Clouse, K. A., Biddison, W. E. & Kung, P. C.: Phenotypes of human natural killer cell populations detected with monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, **127**, 2575-2580 (1981).
- 27) Perussia, B., Trinchieri, G., Jackson, A., Warner, N. L., Faust, J., Rumpold, H., Kraft, D. & Lanier, L. L.: The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: Phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, **133**, 180-189 (1984).
- 28) Phillips, J. H. & Lanier, L. L.: Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon: Rela-

tive contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytolysis. *J. Exp. Med.*, **164**, 814-825(1986).

29) **Itoh, K., Tilden, A. B., Kumagai, K. & Balch, C. M.**: Leu-11<sup>+</sup> lymphocytes with natural killer (NK) activity are precursors of recombinant interleukin 2 (rIL 2)-induced activated killer (AK) cells. *J. Immunol.*, **134**, 802-807 (1985).

30) **Itoh, K., Tilden, A. B. & Balch, C. M.**: Lysis of human solid tumor cells by lymphokine-activated natural killer cells. *J. Immunol.*, **136**, 3910-3915 (1986).

31) **Grimm, E. A., Ramsey, K. M., Mazumder, A., Wilson, D. J., Djeu, J. Y. & Rosenberg, S. A.**: Lymphokine-activated killer cell phenomenon II. Precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory cytotoxic thymus-derived lymphocytes, and natural killer cells. *J. Exp. Med.*, **157**, 884-897 (1983).

32) **Damle, N. K., Doyle, L. V. & Bradley, E. C.**: Interleukin 2-activated human killer cells are derived from phenotypically heterogeneous precursors. *J. Immunol.*, **137**, 2814-2822 (1986).

33) **Ortaldo, J. R., Mason, A. & Overton, R.**: Lymphokine-activated killer cells: Analysis of progenitors and effectors. *J. Exp. Med.*, **164**, 1193-1205 (1986).

34) **Itoh, K., Shiiba, K., Shimizu, Y., Suzuki, R. & Kumagai, K.**: Generation of activated killer (AK) cells by recombinant interleukin 2 (rIL 2) in collaboration with interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). *J. Immunol.*, **134**, 3124-3129 (1985).

35) **Tursz, T., Dokhelar, M. C., Lipinski, M. & Amiel, J. L.**: Low natural killer cell activity patient with malignant lymphoma. *Cancer*, **50**, 2333-2335 (1982).

36) **Yoda, Y., Abe, T., Tashiro, A., Hirose, S., Kawada, K., Onozawa, Y., Adachi, Y., Shishido, H. & Nomura, T.**: Normalized natural killer (NK) cell activity in long-term remission of acute leukemia. *Br. J. Haematol.*, **55**, 305-309 (1983).

37) **Dickinson, A. M., Proctor, S. J., Jacobs, E., Reid, M. M., Walker, W., Craft, A. W. & Kernahan, J.**: Natural killer cell activity in childhood acute lymphoblastic leukemia in remis-

sion. *Br. J. Haematol.*, **59**, 45-53 (1985).

38) **Sorskaar, D., Lie, S. O. & Forre, O.**: Natural killer cell activity of peripheral blood and bone marrow mononuclear cells from patients with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Acta Paediatr. Scand.*, **74**, 433-437 (1985).

39) **Koizumi, S., Yamagami, M., Ueno, Y., Miura, M. & Taniguchi, N.**: Resistance of human bone marrow CFUc to high-dose methotrexate cytotoxicity. *Exp. Hematol.*, **6**, 635-640 (1980).

40) **Herberman, R. B., Reynold, C. W. & Ortaldo, J. R.**: Mechanism of cytotoxicity by natural killer (NK) cells. *Ann. Rev. Immunol.*, **4**, 651-680 (1986).

41) **Graves, S. S., Bramhall, J. & Bonavida, B.**: Studies on the lethal hit stages of natural killer cell-mediated cytotoxicity. I. Both phorbol ester and ionophore are required for release of natural killer cytotoxic factors (NKCF), suggesting a role for protein kinase C activity. *J. Immunol.*, **137**, 1977-1984 (1986).

42) **Taylor, I. W. & Tattersall, M. H. N.**: Methotrexate cytotoxicity in cultured human leukemic cells studied by flow cytometry. *Cancer Res.*, **41**, 1549-1558 (1981).

43) **Taylor, I. W., Slowiaczek, P., Francis, P. R. & Tattersall, M. H. N.**: Biochemical and cell cycle perturbation in methotrexate-treated cells. *Mol. Pharmacol.*, **21**, 204-210 (1982).

44) **Kamiskas, E.**: Effects of methotrexate on ribonucleotide pools in growing and growth-arrested tumor cells and antagonism by RNA synthesis inhibitors. *J. Biol. Chem.*, **257**, 4279-4281 (1982).

45) **Lanier, L. L., Benike, J. C., Phillips, J. H. & Engleman, E. G.**: Recombinant interleukin 2 enhanced natural killer cell-mediated cytotoxicity in human lymphocyte subpopulations expressing the Leu-7 and Leu-11 antigens. *J. Immunol.*, **134**, 794-801 (1985).

46) **Ortaldo, J. R., Phillips, W., Wasserman, K. & Herberman, R. B.**: Effects of metabolic inhibitors on spontaneous and interferon-boosted human natural killer cell activity. *J. Immunol.*, **125**, 1839-1844 (1980).

**Effects of Methotrexate on Natural Killer Cell Activity in Vitro and in Vivo**  
Takayuki Nakarai, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University,  
Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **96**, 290—303 (1987)

**Key words :** methotrexate, interleukin 2, natural killer, lymphokine-activated killer, high-dose methotrexate therapy, malignancy

#### Abstract

The effects of methotrexate (MTX) on natural killer (NK) cell activity in vitro and in vivo were studied. Peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) were separated from normal adult volunteers. Cells were incubated with recombinant interleukin 2 (rIL 2) (25 U/ml) for 48 hrs and then MTX was added at various concentrations ( $10^{-10}$  M- $10^{-6}$  M). After an additional incubation with rIL 2 and MTX for 24 hrs, NK activity was measured by a 4-hr  $^{51}\text{Cr}$  release assay using K562 target cells. When cells were exposed at  $10^{-8}$  M MTX, a significant enhancement of NK activity was observed. PBMNCs were further fractionated into T and non-T cell subpopulations using a sheep erythrocyte rosetting technique. The fractionated T cells showed a significant enhancement of NK activity but non-T cells did not. Furthermore, T cells were treated with Leu-7 and Leu-11 monoclonal antibodies, reactive against NK cells, plus complement to investigate the effect of MTX at the effector cell level. When T cells were treated with Leu-11 plus complement, the levels of NK activity were remarkably decreased and no significant effect of MTX on NK activity was observed, suggesting that a  $\text{E}^+$  Leu-11 $^+$  cell population may be responsible for the augmentation of NK cell activity by MTX. However, lymphokine-activated killer (LAK) activity of these fractionated cells by using HL-60 as target cells was not enhanced after treatment with MTX. The changes of NK activity and NK cell subsets after high-dose MTX therapy (2000 mg/m $^2$ /24 hrs iv) in eleven children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma were also studied. The serum concentration of MTX was increased to  $10^{-5}$  M- $3 \times 10^{-4}$  M and NK activities after treatment were decreased as compared with those before treatment, but the relative proportion of Leu-7 $^+$  and Leu-11 $^+$  cells in these patients' blood mononuclear cells were slightly increased after treatment, suggesting a resistance of NK cells to MTX. These results indicate that it is important to survey the effects of MTX on an immunological anti-tumor defending system such as NK cell activity.