Effects of Methotrexate on Natural Killer Cell Activity in Vitro and in Vivo

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

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

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 5 °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 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^2)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~ 3×10-4 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"やウイルス感染"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⁹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 immunotherapy⁴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^{5)~9)}。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-y, recombinant interferon-y; SRBCs, sheep red blood cells

trexate (MTX) により増強された事を報告してい る10111 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、MTK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12)~14)はかなり進み、 NK 細胞の heterogeneity¹⁵⁾が明らかにされ、LAK 細 胞との異同^{16)~18)}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

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

1. 末梢血単核球の分離

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 (5×10⁶/ml) を直径 6 cm の ブラスチックシャーレ (Falcon, Oxnard, CA) に撒布し、37°C、5% CO₂、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*/ml に調整し、1×10*/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+), ロゼット 非形成細胞分画を non-T 細胞分画 (E-) 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^{-11} M \sim 10^{-6} M), PBMNCs, T細胞, non-T細胞浮遊液に添加した (最終濃度 2×10^6 /ml)。又上記の系に rIL 2 (武田製薬,大阪)或いは recombinant interferon- γ (rIFN- γ) (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 51 Cr (Na 51 CrO4. 1 mCi/ml, New England Nuclear, Boston, MA) でラ ベル後, 1×10⁵/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℃5%CO₂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, 51Cr 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) \times 100: maximum release は target 細胞に1% Triton X を加えた際の⁵¹Cr放出量を示し, spotaneous release は培養液のみを加えた際の target 細胞の 51Cr 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19)

effector 細胞と target 細胞を同数混合し(各々 2×10^6 /ml の濃度で 0.1 ml), $150 \times g$ で 5 分間遠心後, 37° C 5 % CO_2 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

unfractioned, 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螢光法で解析した. 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($2 \times 10^6/\text{ml}$) $0.1\,\text{ml}$ に各種単クローン抗体を $2 \sim 5\,\mu\text{l}$ 加え, $4\,^{\circ}\text{C}$ 30 分静置後 PBS で 1 回洗浄後,螢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 U OK-NK (Leu-11b) (CD16) (Ortho Diagnostic System)を使用した、 $1\times10^7/\text{ml}$ 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 $2\times10^6/\text{ml}$ 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 $1\sim15$ 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/m²)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/m²を 2400 ml/m²のソリタ T_3 500 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/m² 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.

% of control= {% cytotoxicity (patient)/ % cytotoxicity (control)}×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螢光法によった。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、抗原陽性細胞の絶体数を算出した。 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。

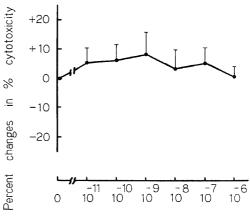
III. 統計的処理

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が有意差はなく, 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



Methotrexate concentration (M)

Fig. 1. Effect of MTX on NK cell activity.

PBMNCs were incubated with MTX at various concentrations for 48 hrs at 37 $^{\circ}$ 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~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

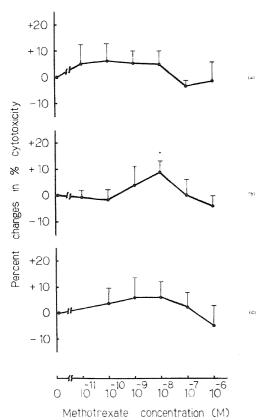


Fig. 2. Effect of MTX on rIL 2-activated NK cell activity.

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 rIL 2(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 ± 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} $M\sim10^{-7}$ M)で NK 活性の増強を認め

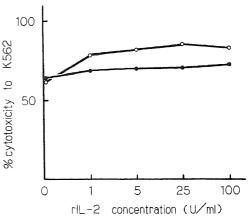


Fig. 3. Effect of rIL 2 on NK cell activity. PBMNCs were incubated for 72 hrs with rIL 2 at various concentrations (0 to 100 U/ml). MTX (10⁻⁸ M) (—) was added in the last 24 hrs. Data from one of two similar experiments are presented. •• control without MTX.

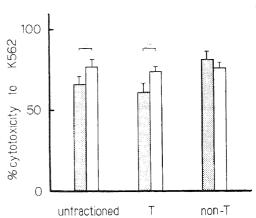


Fig. 4. Effect of MTX on rIL 2-activated NK cell activity in unfractioned, T and non-T cell subpopulations.

Each cell subpopulation was incubated with rIL 2 (25 U/ml) for 72 hrs. In the last 24 hrs, MTX ($10^{-8}\,\mathrm{M}$) () 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; , 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 PBMNCs 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 $62\sim65\%$ 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、PBMNCsを予め、unfractioned (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 ± 3.9%、非添加群 65.6 ± 4.3% (p<0.005)、T細胞:MTX 添加群 73.3 ± 3.0%、非添加群 60.2 ± 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 $76.1\pm2.1\%$,非添加群 $80.4\pm4.2\%$ と両者間に有意差はなかった。 T 及びnon-T 細胞の分画時,両者の絶体数はおよそ $3\sim4:1$ 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 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 と変化させた増合の 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	
Before treat	(%)	medium alone (%)	MTX 10 ⁻⁸ M (%)
Γ 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(25Uml) for 72 hrs 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

unfractioned, 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-γの影響 (図 8)

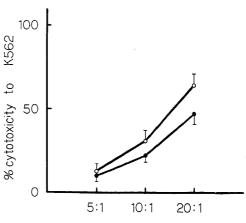
PBMNCs を各種濃度の rIFN·y と MTX (10-8 M) とともに 48 時間培養後, NK 活性を測定した. NK 活性は濃度依存的に上昇したが, MTX 添加による活性の増強は認められなかった.

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^{-8} 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-11 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 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 の割合は有意の変動を示さなかった。

MTX の NK 活性に及ぼす影響については幾つか



Effector target ratio

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) (0-0) was added. The data are expressed as the mean ± S.D. of three experiments.

ontrol without NTX.

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

	T cells tre	eated with
	medium alone	MTX 10 ⁻⁸ M
Conjugate formation	11.0% ± 3.4%	12.2% ± 2.7%

T cells were treated with rIL 2(25U/ml) for 72 hrs and in the last 24 hrs, 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.

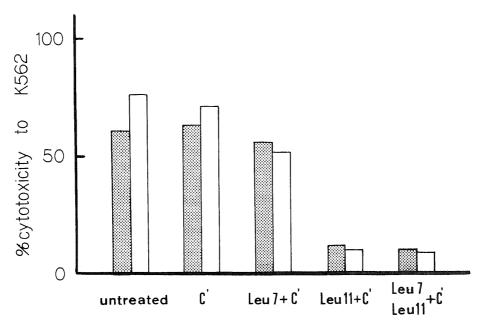


Fig. 6. Changes in NK cell activity of rIL 2-activated T cells after treatment with monoclonal antibodies and complement.

T cells were incubated with rIL 2 (25 U/ml) for 72 hrs. In the last 24 hrs. MTX ($10^{-8}\,\mathrm{M}$) (\square) 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. \square , control without MTX.

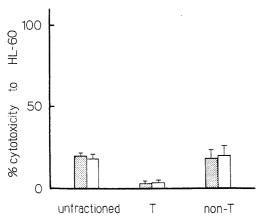


Fig. 7. Effect of MTX on LAK activity of unfractioned, T and non-T cell subpopulations. Each cell subpopulations was incubated with rIL 2 (25 U/ml) for 72 hrs. In the last 24 hrs, MTX (10-8 M) () was added and LAK assay was carried out by using HL-60 target cells. The data are expressed as the mean ± SEM of three experiments.

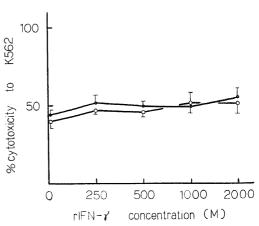


Fig. 8. Effect of rIFN-γ on NK cell activity. PBMNCs were incubated for 48 hrs with MTX (10⁻⁸ M) (ΦΦ) and rIFN-γ at various concentrations (0 to 2000 U/ml). The data are expressed as the mean ± S.D. of three experimets. ΦΦ, control without MTX.

Table 3. Changes of NK cell population and NK activity during high dose-MTX therapy (a) The absolute number of Leu1⁷ and Leu11¹ cells, and NK activity

	?:. (1)											
		Befor	Before HD-MTX therapy			Ohr aft	Ohr after HD-MTX therapy			48hr af	48hr after HD-MTX therapy	
Pat.	WBC	No. (%) of lymphocytes	No.(%) of Leu7* and Leu11* cells	NK activity % of control	WBC	No. (%) of lymphocytes	No.(%) of Leu7* and Leu11* cells	NK activity % of control	WBC	No. (%) of lymphocytes	No.(%) of Leu7* and Leu11* cells	NK activity % of control
	(/mm³)	(/mm³) (/mm³)(%)	(/mm ₃) (%)		(/mm/)	(/mm ₃)(%)	(/mm ₃) (%)		(/mm³)	(/mm ₃)(%)	(/mm³) (%)	
1.M.K.	2600	650(25%)	Leu 7 163(25.1%)	21.3%	1700	612(36%)	Leu 7 127(20.7%)	30.6%	1100	737(67%)	Leu 7 361(49.1%)	31.3%
		,	Leull 24(3.7%)				Leull 32(5.5%)				Leull 34(4.7%)	
2.A.T.	3500	1365(39%)		71.8%	3200	(%06)096	Leu 7 217(22.6%)	60.7%	2900	580(20%)	Leu 7 217(21.2%)	53.3%
			Leull 602(44.1%)				Leull 256(26.7%)				Leull 170(29.3%)	
3.H.M.	2600	2350(42%)	Leu 7 143(6.1%)	88.0%	4900	1666(34%)	Leu 7 122(7.3%)	121.7%	3300	1248(32%)	Leu 7 39(3.1%)	74.8%
			Leull 691(29.4%)				Leull 680(40.8%)				Leull 388(31.1%)	
4.Y.N.	2500	1200(48%)	Leu 7 475(39.6%)	88.1%	2100	798(38%)	Leu 7 273(34.2%)	49.7%	2100	735(35%)	Leu 7 445(60.6%)	46.4%
			Leull 254(21.2%)				Leu11 -				Leull 189(25.7%)	
5.N.A.	2300	943(41%)	Leu 7 110(11.7%)	89.0%	2900	783(27%)	Leu 7 128(16.3%)	1	1800	360(20%)	Leu 7 123(34.2%)	81.2%
			Leu11 204(21.6%)				Leull 229(29.3%)				Leull 269(74.7%)	
6.G.M.	3900	1053(27%)	Leu 7 217(20.6%)	49.7%	3500	1085(31%)	Leu 7 315(29.0%)	55.5%	2300	805(35%)	Leu 7 309(38.4%)	l
	_		Leull 85(8.1%)				Leull 202(18.6%)				Leull 212(26.3%)	
7.N.H.	2900	2065(35%)		67.0%	4100	1599(39%)	Leu 7 726(45.4%)	58.2%	3200	1085(31%)	Leu 7 666(61.4%)	I
			Leull 293(14.2%)				Leull 550(34.4%)				Leull 345(31.8%)	
8.M.T.	3900	1755(45%)	Leu 7 372(21.2%)	1	2900	1421(49%)	Leu 7 419(29.5%)	ı				
	_		Leull 47(2.7%)				Leull 261(18.4%)					
9.N.F.	5500	715(13%)	Leu 7 39(5.4%)	120.7%	2400	648(27%)	Leu 7 13(2.0%)	37.4%	1900	380(20%)	Leu 7 46(12.0%)	53.3%
			Leull 427(59.7%)				Leu11 279(43.1%)				Leull 174(45.8%)	
10.E.Y.	2600	884(34%)	Leu 7 122(13.8%)	23.0%	4100	738(18%)	Leu 7 75(10.1%)	%6.09	3200	608(19%)	Leu 7 85(13.9%)	30.1%
			Leull 93(10.5%)				Leull 157(31.3%)				Leull 186(30.6%)	
2 - 1	2700	1215(45%)	Leu 7 180(14.8%)	89.3%	2400	864(36%)	Leu 7 342(39.6%)	84.9%	1300	416(32%)	Leu 7 96(23.1%)	45.5%
			Leull 230(18.9%)				Leull 431(49.9%)				Leull 117(28.1%)	

The absolute number of Leu7* or Leu11* cells was calculated by multipling the relative proportion of Leu7* or Leu11* cells by the total number of Iymphocytes. NK activities (% cytotoxicity) for the control PBMNCs 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.

井

の報告があり5)10)11), 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~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 51Cr 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 51Cr 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 heterogeneity¹⁵⁾が存在することがわかった。又、その cell lineage²³⁾や LAK 細胞との異同¹⁶⁾⁻¹⁸⁾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)²⁴⁾、Leu-7 (HNK-1)²⁴⁾、Leu-19 (NKH-1)¹³⁾¹⁴⁾、 OKM1 (CD11)²⁵⁾、 OKT11 (CD2)²⁶⁾²⁷⁾、 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¹³⁾²⁸⁾は、LAK 細胞の precursor の大部分は Leu-19+ CD5- (その 90%以上は CD16+ CD3-)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29/30/もほぼ同様な結果 で、CD3-CD16+ Leu-7- が LAK 細胞の precursor の 大部分を占め、effector は CD16+ Leu-7+ であったと 報告している。又, Schmidt ら14)や Ortald ら33)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³¹)は LAK 細胞の precursor は E-, CD3-, Leu-7-, OKM1-0 non-T, non-B lymphocytes であったとしている。一方 Damle ら32は LAK 細胞の precursorは多種多様で, CD16+ だけでなく, CD4+, CD8+, CD20 (B1)+ 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+ 細胞の割合は約 50%~80%²⁶⁾²⁷⁾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+細胞のNK活性が増強 されたにもかかわらず, E-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+ Leu-11+ 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¹²⁾により、NK 細胞のごく一部に CD3+ CD16+ 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+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+ and Leu-11+ cells, and NK activity

	Ohr after therapy	48hrs after therapy
Leu-7	1.12±0.54 (n=11)	$1.04\pm0.61 (n=10)$
Leu-11	$1.37 \pm 0.60 \ (n=9)$	$1.11\pm0.77 (n=9)$
NK activity	$0.94 \pm 0.33 \ (n=9)$	$0.94\pm0.31 (n=8)$

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

= Absolute number of Leu-7⁺ or Leu-11⁺ cells of 0hr or 48hrs after therapy

Absolute number of Leu-7+ or Leu-11+ cells before therapy

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

= NK activity of 0hr or 48hrs after therapy

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^- であるというGrimm³ 31 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- 31 (CD16)陽性細胞の割合は T 細胞分画より多く、それらが rIL 2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 $^{12)28)$ や Itohら $^{29)30}$ の報告とも矛盾しない。

IL 2 は NK 活性を増強させると同時に NK 細胞より IFN- γ 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- γ が関与しているか否か検討する必要があろう 34 . 著者の成績では rIFN- γ 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"は MTX 添加によって IFN- γ の放出が増加するか否か検討したが,IFN- γ 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- γ とともには 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35)-38), 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+ 或いは Leu-11+ 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39). 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~3×10-4 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 ~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、 $96.0\%\pm4.5\%$),高濃度の MTX $(10^{-5}\,\mathrm{M}\sim10^{-4}\,\mathrm{M})$ 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- $11^+\,\mathrm{OKT11}^+\,$ 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 Leu $11^+\,$ 細胞中の OKT $11^+\,$ 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- $11^+\,\mathrm{NK}\,$ 細胞は、OKT $11\,\mathrm{抗原}$ 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⁴⁰⁾. 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、プロテンインキナーゼ C の活性化、それによる蛋白合成が必要といわれており⁴¹⁾、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42)43)は, MTX 2×10-8 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~2×10⁻⁸ M では, 細 胞内の ATP, TTP, GTP の量がコントロールの 10% ~15%まで減少したと報告している. Kamiskas44)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45)46). 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 ~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、

井

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+ 細胞 (E+ Leu-11+)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^{-6} M $\sim 3 \times 10^{-6}$ 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^+ 或いは Leu- 11^+ 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^+ OKT 11^- 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⁺ 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-γ 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 Leull⁺ and Leu-ll⁻ 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 subsest 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 recepter 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 lymhokine-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⁺ 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 heterogenous 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- γ (IFN- γ). 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., Hirosawa, 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. Juzen 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 concentraions (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 51Cr 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 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/m²/24 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-3×10⁻⁴ 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.