

や転移の制御などにおいて重要な役割を演じているとされている Natural Killer (以下 NK) 細胞に及ぼす Hyperthermia の影響についてまず検討し、さらにその mechanism について、生細胞のミトコンドリア内膜と特異的に結合しその膜電位を反映する蛍光色素である Rhodamine123 (以下 Rh123) を用いた解析を試み、興味ある結果を得た。

材料と方法

健康成人のヘパリン化末梢血より比重遠心法にて末梢血リンパ球 (PBL) さらに Large Granular Lymphocyte (LGL) を分取した。NK 活性は、Target として K562 を使用し、 ^{51}Cr release assay にて行なった。Single cell cytotoxicity assay (SCCA) は Timonen らの方法をやや改変して行い、%Binding と cytotoxic effector (%C.E) とを求めた。in Vitro 加温は、Effector cell を tube に分注し、種々の温度に設定した water bath に浸して行なった。Rh123 染色は $10\mu\text{g/ml}$ 、20分間 incubate して行ない、その uptake は Flow cytometry (FACS-IV) にて解析した。また PBL が K562 と conjugate をつくったあと、Effector 内部で進行する反応のうち mitochondria の動向を polarization assay にて検討した。まず PBL と Target との conjugate を Rh123 にて染色したあと蛍光顕微鏡にて観察し、PBL の mitochondria が Target cell との結合面により強く偏位している場合を polarization (+)、at random な分布しかみられない場合を polarization (-) と判定し、100個以上の conjugate を観察したあとその polarization rate を算出した。

結果

- 健康成人20名の control (37°C) における NK 活性は $55.1 \pm 13.5\%$ であったが、これを relative cytotoxicity として100%と設定すると、加温処理 (42.5°C , 1時間) にて $7.2 \pm 3.7\%$ と著明に低下した。一方 Trypan blue による viability は、加温直後からすくなくとも assay がおわる 5時間目までは有意な変化は認められなかった。
- SCCA では、PBL の %C.E は 20.7% から 9.2% へと加温処理にて有意に低下した。LGL-enriched fraction を effector とすると %Binding も 18.1% から 13.1% へと低下した。
- Effector を Rh123 にて染色し、FACS-IV にて解析すると、LGL-depleted fraction の peak channel を 100 と設定した場合、LGL-depleted fraction は 144 ± 10.9 と有意に高い uptake を示した。 K^+ ionophore であり mitochondria 内膜の膜電位を低下させる valinomycin にて前処理すると PBL の Rh123 の uptake は著明に低下した。また valinomycin を NK の assay 系のなかに添加すると濃度依存性に

白石 円 樹 (長崎県) 昭和26年10月2日生

授与年月日 平成2年4月30日

主論文 Hyperthermia の Natural Killer 活性に及ぼす影響
—Rhodamine123 を用いたその低下機序の解析—

論文内容の要旨

緒言

Hyperthermia は癌の集学的治療の一翼として徐々に臨床応用が進められつつあるが、局所における一定の腫瘍縮小効果が必ずしも予後の改善に至っていないという報告がみられるのも事実である。この要因のひとつに Hyperthermia が転移あるいは担癌宿主の免疫能に及ぼす影響が考えられる。そこで、腫瘍の発生

cytotoxicityを抑制した。これらの結果からNK細胞の細胞傷害機構に mitochondria 内膜の高い膜電位が関与していることが強く示唆された。

4). そこで加温処理後、継時的にPBLのRh123のuptakeを検討すると、Histogramのpeak channelはcontrolの 100.4 ± 4.5 に比べて加温後5時間目には 96.0 と有意に低下していた。

5). polarization rateはcontrolの $50.0 \pm 8.2\%$ にたいし、加温処理後のPBLでは $25.5 \pm 8.2\%$ と有意に低下していた。

考案ならびに結語

加温処理によりNK活性が低下するという事実はすでにAzocarやKallandらにより報告されているが、そのmechanismについては明らかにはされていない。NK細胞の細胞傷害機構はTarget cellとの結合に始まり、lytic factorの放出に至るという一連の仮説は広く認められているものの各段階の詳細については合意に至っているという事項は少なくその解析は困難である。そこで、まず著者はNK細胞の細胞傷害機構は mitochondria 内膜の高い膜電位に依存していることを示し、さらに加温処理後はRh123のuptakeが低下することから、mitochondria 内膜の膜電位の低下がHyperthermiaによるNK活性低下のひとつの要因であることを示した。さらにNK細胞がTarget cellと結合したあとはその結合部位に高頻度にmitochondriaのpolarizationが出現していることを見出し、さらに加温処理にてこのpolarizationが低下することからMicrotubuleなどの細胞骨格にたいする影響もNK活性の低下の要因として考えられることを示した。

論文審査の結果の要旨

白石円樹は昭和54年3月長崎大学医学部を卒業後長崎大学医学部附属病院、国立長崎中央病院で外科一般について研修し、その後北松中央病院、北九州市八幡病院、田川市立病院を歴任し外科診療の経験を重ね外科学を修得した。とくに消化器癌の外科的治療に興味をもち、外科治療とくに補助療法としての温熱療法に強い興味を懐き研究活動を行った。

平成2年主論文：Hyperthermiaのnatural killer活性に及ぼす影響—Rhodamine23を用いたその低下機構の解析—を完成し参考論文26篇を附して長崎大学医学部研究科委員会に医学博士の学位を申請した。

長崎大学医学研究委員会はこれを平成2年2月21日の定例委員会に付議し、論文内容の要旨を検討し、研究歴を審議した結果受理して差し支えないものと認めためたので、上記の通り審査委員を選定した。委員は主査を中心として慎重審査の上平成2年4月11日の定例委員会での結果を報告した。

主論文は癌に対する集学的治療の一貫として考えられ、臨床にも広く応用されるようになった温熱療法に注目し従来から局所における癌細胞に対する効果を期待して行われて来たが、転移ないし担癌宿主の免疫能に及ぼす影響について研究されていないのが現状である。

本論文ではnatural killer(NK)細胞に及ぼす温熱の効果についてミトコンドリア内膜の膜電位を反映する蛍光色素Rhodamine123(RH123)を用いてその機序の解明を試みた。

末梢血より比重遠沈法で末梢血リンパ球およびlarge granular lymphocyteを分取しNK活性はK562をTargetとして ^{51}Cr release assayで行った。

Cytotoxic assayはTimonenの方法を用い%bindingとcytotoxic effectorを求めた。Rh123uptakeはFlow cytometryで解析した。またPBLとtargetとのconjugateをRh123で染色後蛍光顕微鏡で観察し、結合面への偏位をpolarization(+)として100個以上の観察でpolarization rateとして算出した。

その結果加温によりNK活性Cytotoxicityは低下したがTrypan-blueによるviability判定では明らかでなく、Single cell cytotoxic assay及びcytotoxic effector共に低下しlarge granular lymphocyte添加によりbindingも低下した。mitochondria膜電位を低下させるValin omycinで前処理するとRh123染色に反映されるPBLのuptakeは著明に低下した。

また、加温後のpolarization rateもcontrolに比し低下することが認められた。すなわち、加温により膜電位が低下しNK活性が低下する事実を明らかにした。

以上の所見は温熱療法により癌細胞のviabilityは障害されるが免疫学的にはNK活性の低下がmitochondriaの膜電位低下に関連しておこる機序を明らかにしたもので従来にみられない新発見で学位に値するものとして合格した。

審査担当者 主査 教授 富田 正雄
副査 教授 齊藤 泰
副査 教授 小坂 光男