

古賀成彦(福岡県)昭和27年9月24日生

授与年月日 平成3年7月31日

主論文 — BCGにて誘導された細胞障害活性
に関する研究 —

論文内容の要旨

緒言

Bacillus Calmette-Guerin (BCG) は、非特異的免疫療法として白血病や悪性黒色腫などの治療薬として使われていた。1976年, Morales らが表在性膀胱癌に対する BCG 膀胱内注入療法の有用性を報告して以来, 多くの追試がなされ, これを支持する報告が多い。しかし, その作用機序については不明な点が多く, 議論のあるところである。今回, われわれは, BCG の末梢血リンパ球に対する作用について検討を加えた。

材料および方法

1) Effector 細胞: BCG 膀胱内注入患者よりヘパリン加採血を行い, 比重遠心方にて単核球を分離し, Plastic dish にて単球を除去して得られたリンパ球を effector 細胞とした。又, *in vitro* では膀胱癌患者および正常人のリンパ球を BCG と共に培養して Killer 細胞を誘導した。BCG は $5\mu\text{g/ml}$ 付近の濃度が Killer 活性を誘導するのに最適であった。

2) Target 細胞: NK 感受性の K562 細胞, NK 抵抗性細胞として Raji 細胞, Daudi 細胞, T-24 細胞などを使用した。

3) 細胞障害活性: 細胞障害活性は ^{51}Cr -release assay にて行った。

4) Criss cross cold target competition test: killer 細胞の認識機構の1つを見るため, cold target competition test を行った。Raji 細胞, Daudi 細胞, K562

細胞を⁵¹Crでラベルして、ラベルしていない Raji 細胞、Daudi 細胞、K562 細胞を混合し、binding receptor の競合状態を見た。

5) Effector の phenotypes: Effector および前駆細胞の phenotypes を見るため、抗 Leu1 抗体、抗 Leu3a 抗体、抗 Leu7 抗体、抗 Leu1b 抗体と幼若ウサギ補体にて処理後、細胞障害活性を見た。

結果

1) BCG 膀胱内注入患者の末梢血リンパ球中に出現する細胞障害活性

BCG 膀胱内注入は、週1回80mgのBCGを生理食塩水に溶解して行い、6回行う事を原則とした。BCG 膀胱内注入後3日目の末梢血リンパ球を effector とし、target としてNK抵抗性のRaji細胞を用い細胞障害活性を測定した。BCG 膀胱内注入後、次第に細胞障害活性が出現した。

2) BCG にて誘導された細胞障害活性の target spectrum

このような障害活性をもつ effector がどのような性質を持つものか *in vitro* にて検討した。Effector はNK感受性腫瘍細胞ばかりでなく、NK抵抗性腫瘍細胞にも障害活性を持っており、target spectrum は通常のNK細胞よりも広がっていた。

3) BCG にて誘導された細胞障害活性の kinetics

培養時間による細胞障害活性の kinetics を見ると、活性は24時間以内出現し、3日目までプラトーになっていた。

4) 細胞障害活性における Cytosine arabinoside の作用

DNA 合成阻害剤である Cytosine arabinoside 存在下でも BCG にて細胞障害活性は誘導された。

5) BCG にて誘導された effector 細胞、およびその前駆細胞の phenotypes

BCG にて誘導された effector 細胞の前駆細胞となる人末梢血リンパ球を抗 Leu7 抗体、抗 Leu1b 抗体と補体で処理すると細胞障害活性が低下し、抗 Leu1 抗体、抗 Leu3a 抗体で処理しても、細胞障害活性の低下は見られなかった。又、BCG にて誘導された effector も同様の結果で、前駆細胞、effector とともに NK タイプであった。

6) Cold target competition test

Raji 細胞、Daudi 細胞、K562 細胞は互いに競合し、BCG に誘導された killer 細胞に感受性のある target 細胞は、同じ細胞表面構造によって認識されていることがわかった。

考察

BCG の作用機序については不明な点も多いが、今回、われわれの実験では、*in vivo*、*in vitro* において BCG

により非特異的な細胞障害活性が出現することがわかった。この effector の性状は、phenotype がNK細胞様であるが、通常のNK細胞と異なり target spectrum 広く、BCG との培養で24時間以内に出現する。この細胞障害活性を測定することにより、個々の患者に合った至適投与法ができる可能性がある。

論主審査の結果の要旨

古賀成彦は昭和54年3月31日長崎大学医学部を卒業、同年6月1日より沖縄県立中部病院にて2年間、研修医として勤務、引き続き昭和61年4月30日迄同病院に勤務した。昭和61年5月1日から長崎大学医学部附属病院泌尿器科医員、昭和62年4月1日から研究生として北九州市立八幡病院に勤務した。昭和63年4月1日より長崎大学医学部泌尿器科学教室助手となり現在に至る。この間、泌尿器科学教室斎藤泰教授の指導のもと泌尿器科学の研究に従事し、多くの業績をあげ、学位論文「BCG にて誘導された細胞障害活性に関する研究」を完成、参考論文8編を附して長崎大学大学院に医学博士の学位を申請した。長崎大学大学院医学研究科委員会はこれを平成3年6月5日の定例委員会に付議し、論文内容の要旨を検討し、研究歴の審査の結果、受理を決定後、上記3名の審査委員を選定した。同委員らは主査を中心として慎重に審査し、平成3年7月17日の大学院研究発表会にて同上学位論文を発表、質疑応答した。同日の定例大学院医学研究科委員会でその結果も併せて報告した。

同論文は Bacillus Calmette-Guerin (BCG) の膀胱癌に対する非特異的免疫療法の作用機序をBCGの末梢血リンパ球に対する作用、とりわけ細胞障害活性の誘導について検討したものである。

BCG 膀胱内注入 (BCG 80 mg/週、6回を原則) を受けた膀胱癌患者末梢血リンパ球には、BCG 注入後3日目には、NK抵抗性Raji細胞に対する細胞障害活性が出現した。膀胱癌患者もしくは健康人の末梢血リンパ球をBCGと共に培養 (BCG 5μg/mlが至適) したところNK感受性腫瘍細胞に加えてNK抵抗性腫瘍細胞に対しても細胞障害活性を示し、target spectrum が通常のNK細胞よりも広がっていた。この細胞障害活性はDNA合成阻害剤 cytosine arabinoside 存在下でも誘導し得た。これらのBCGで誘導された細胞障害活性を有する effector 細胞及びその前駆細胞は共に、Leu7、Leu1b 抗体と補体での処理に感受性を示すが、Leu1、Leu3a 抗体と補体での処理には抵抗性であった。この事は前駆細胞及び effector 細胞の両方がNK細胞タイプの表面形質を有することを示している。BCG 誘導細胞障害性 effector 細胞により破壊される Raji 細胞、Daudi 細胞、K562 細胞は、阻害試験により互いに競合し、effector 細胞によりこれらの細胞の同じ細胞

胞表面分子が認識されている可能性が示唆された。

本研究は、膀胱癌を含めた各種人癌における BCG 療法の作用機序の解析を大きく前進させたものである。本研究の成果が今後、臨床医学分野、免疫生物学分野に与える影響は大きいと思われる。医学研究科委員会は審査委員の報告に基づいて、これを討論に付して審査した結果、学位に値するものとして合格とした。

審査担当者 主査教授 珠玖 洋
副査教授 矢野 明彦
副査教授 吉田 彦太郎