

ヒト末梢血中リンパ球のADCC活性の検討

東京女子医科大学附属成人医学センター (所長：渋谷 実教授)

佐々木功一・前島 祐子・今井 和子・根津真知子・

佐藤 律子・上地 六男・前田 淳・赤上 晃・

富松 昌彦・松野 堅・三輪 洋子・助教授 山下 克子・

教授 横山 泉・教授 市岡 四象

(受付 昭和55年11月25日)

Investigation of ADCC (Killer Cell Population) in Various Diseases**Kōichi SASAKI, Yūko MAEJIMA, Ritsuko SATO, Kazuko IMAI, Machiko NEZU,
Masahiko TOMIMATSU, Yōko MIWA, Katasi MATSUNO, Atsusi MAEDA,
Akira AKAGAMI, Mutsuo UECHI, Katsuko YAMASITA,
Izumi YOKOYAMA and Shisho ICHIOKA**

The Institute of Adult Disease (Director; Prof. Minoru SHIBUYA)

Tokyo Women's Medical College

The author improved the technique of obtaining monolayer of K-cells and used the result in the clinical examination of patients.

The conclusion reached is as follows:

- 1) An investigation was made to obtain a more uniform monolayer of K-cells in a shorter time, and a satisfactory result was gained at a cell density of 5×10^8 /ml.
- 2) In patients with chronic hepatitis, ADCC activity was 6.30 ± 0.91 and was lower than in healthy persons, but the difference between the two groups was not significant. The activity of ADCC changed in parallel with that of serum transaminase in chronic hepatitis patients.
- 3) In patients with duodenal ulcer, ADCC activity was 6.33 ± 0.88 and lower than in healthy controls. The activity tended to decrease in the active stage of ulcers in the same manner as seen in blood immunoglobulin levels (IgG).
- 4) In patients with cancer of the stomach, ADCC activity was 8.10, and was higher than in healthy persons.
- 5) In patients with diabetes mellitus of the adult type, ADCC activity was 7.16 ± 0.85 , and was about the same as in healthy persons.
- 6) From the above mentioned results, the K-cell which is an effector cell of ADCC activity was found to have some action on the pathogenesis in these diseases.

緒 言

昨今、細胞性免疫と体液性免疫の中間的な位置づけをされている ADCC (Antibody dependent cell-mediated Cytotoxicity) が注目されている。今回、Perlmann らのブランク Assay 法¹⁾に基づいたマイクロプレート法について臨床応用を試みたので報告する。

対 象

当センター受診者より、胃・十二指腸潰瘍21例、慢性肝炎20例、糖尿病3例、胃癌 (Borrmann III型進行癌) 1例、正常者34例を対象とした。

方 法

日本抗体研究所の ADCC 測定用キットを用い、以下の点について標的赤血球の濃度をかえて検討した。即ち1つは単層附着作製の標的赤血球 (1×10^8 個/ml) を $5\mu\text{l}$ 分注し、単層附着の作製を行い (以下改良1とする)、さらに低濃度標的赤血球 (5×10^8 個/ml) を $10\mu\text{l}$ 分注し単層附着の作製 (以下改良2とする) を行い、改良1と比較検討をした (Fig. 1)。固定染色終了後、マイクロプレートを反転、400倍で鏡検、ブランク形成細胞によつて K cell population を測定した。

成 績

K Cell population は、Fig. 2 に示すとおり正常者34例、 7.15 ± 1.19 、慢性肝炎21例、 6.30 ± 0.91 、胃、十二指腸潰瘍20例、 6.33 ± 0.88 、糖尿

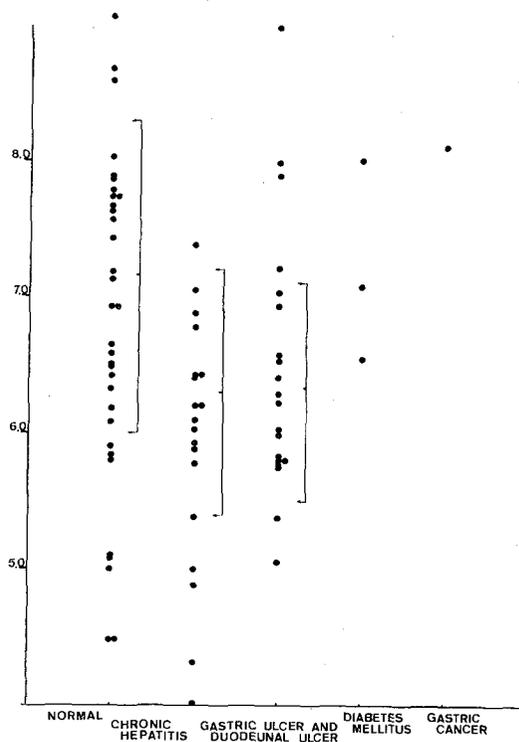


Fig. 2 K cell population

病3例、 7.16 ± 0.85 、胃癌 (Borrmann III型進行癌)、 8.10 であった。各疾患における有意差検定を行なつたところ、正常群との間には有意差は認

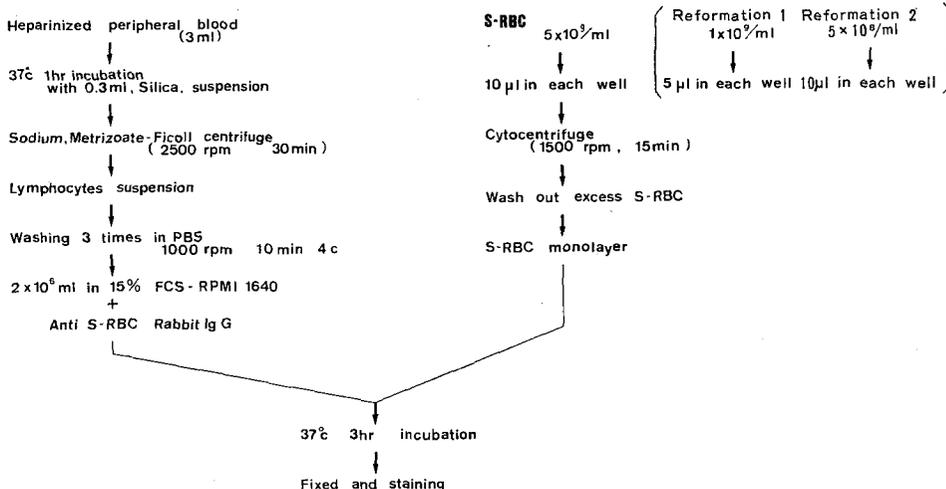


Fig. 1 K cell assay system

考 察

1965年 Möller²⁾ は, ADCC (Antibody dependent cell-mediated Cytotoxicity) についてはじめて報告し, その後多くの報告³⁾⁴⁾がなされたが最近では Perlmann らのプラーク assay¹⁾法が注目されている. この反応は 標的細胞膜抗原に結合した極めて微量の特異抗体の存在下で, その抗体の Fc 部分を介して, 補体系の関与なく標的細胞を破壊する細胞障害機構である. この標的細胞の破壊は抗体の特異性に依存しており, 特異抗原ばかりでなく可溶性抗原, ハプテンと結合した系においても, その特異抗体存在下で起こるとされている³⁾⁴⁾. 今回は Perlmann らの方法について検討を行い, ADCC の臨床的意義について若干の知見を得たので報告する.

1. 操作方法について

ADCC の測定には, ⁵¹Cr-release Cytotoxic assay⁵⁾ または Takasugi and Klein らの micro cytotoxicity test⁶⁾ が頻用されているが著者らは, Perlmann らのプラーク assay 法¹⁾に基づくマイクロプレート法に若干の工夫を試みた⁷⁾. Perlmann の測定法における単層附着の作製は, 成層の良否を大きく左右するきわめて重要な問題である. 改良1のごとく標的赤血球半量 5 μ l 分注で行うと, 短時間での過剰血球除去ができる反面, 単層形成はあまり良い結果が得られなかつた. 一方, 改良2の方法で行えば過剰血球除去および単層形成は十分に満足のものことができ, さらに操作時間の短縮にもつながると考えられ, 著者らはこの方法に従った. この方法によつて検討した今回の成績は, 従来の報告⁸⁾とほぼ一致する結果が得られ, その意味で標的赤血球濃度の調整はプラーク形成法をさらに簡便なものにしたと言えよう.

2. 各種疾患における ADCC 活性について

十二指腸潰瘍の場合一般に組織内における IgG の分布は各病期によつて特に変化はみられないとされているが, 活動期にわずかに IgG containing cell が増加し, さらに血清中の IgG を各病期に分けて測定した場合は, 治癒期, 瘢痕期に比べ, 注

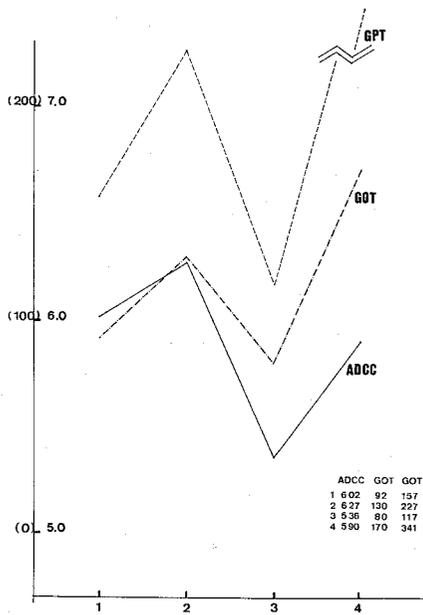


Fig. 3 T.T. 55, Male chronic hepatitis

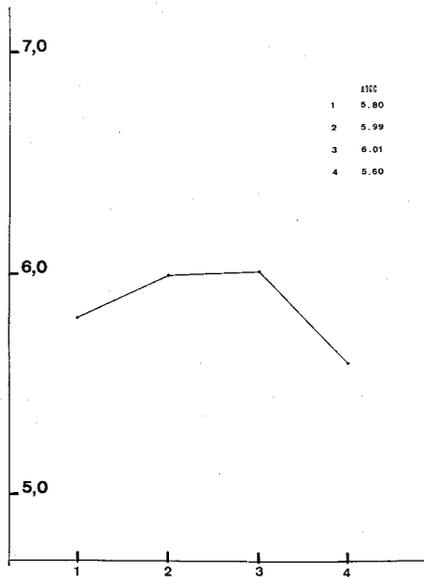


Fig. 4 Y.A. 67 Male Duodeanal ulcer and diabetes mellitus

められなかつた. Fig. 3は Hb 抗原陰性の非活動型慢性肝炎の症例である. Fig. 4は十二指腸潰瘍および成人型糖尿病の症例である.

助期がやや低値を示すと言われている⁹⁾。このことは、ADCCに関連する抗体が一般にIgGとされている¹⁰⁾ことから活動期におけるK cell populationの低下は十分推測されることである。事実、今回経過を追った再発性潰瘍症例でのK cell populationが低下を示したことはうなずける。症例数が少ないので結論的なことはひかえたいが、この点をふまえて今後さらに十二指腸潰瘍とADCC活性の関連について検討を加えたい。

慢性肝炎では一般にしばしば hypergammaglobulinemiaをとまない、また Cryoglobulinemiaの存在は immune Complexとの関連から注目されてきている。immune Complexの存在はそれ自体でも肝細胞障害を起し得るとともに他の合併症をも惹起すると言われている¹⁰⁾。またこのような機構でおこる肝障害を immune Complex diseaseとしてとらえる報告もみられ¹¹⁾、ADCCの effector cellであるK cellを、ブロックしてしまう可能性を持つているといわれている¹⁰⁾。この考えに従えばFcリセプターを介してのK cellの司定では、K cellそのものが同定できず低値を示すのではないかと推測される。また福本¹²⁾らは慢性肝炎患者血清中に胸腺細胞障害性自然自己抗体(NAT)様のリンパ球障害因子を認めており、このためK cellが障害を受ける可能性も推測している。今回われわれの成績も健常者に比べ低い値を示した。これは1つに immune Complexの存在によつてK cellの反応がブロックされた結果によるものではないかとも考えられる¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。

一方、末梢血と組織内K cellは必ずしも平行しないと言われ、炎症の場である組織内でのK cellの変動の検討が必要である。また肝炎における血清トランスアミナーゼ値と、K cell populationとの相関をみると同様な推移を示した。これは血清トランスアミナーゼの上昇が肝細胞壊死を反映するもので、肝細胞破壊をすとされているK cellも上昇し、壊死細胞の消失再生による血清トランスアミナーゼの正常化に対しK cellも低下することが考えられる。

胃癌におけるK cell populationは、現時点で

は正常群と比較して、有意な差を認められないと言われている¹⁶⁾。胃癌例でK cell populationが高値を示す場合は長期間生存すると言われている¹⁷⁾。今回のわれわれの成績では、正常群に比べ高い値を得た。この症例は、現在手術により切除を行い経過観察中であり、おつて術後変化を報告したい。

糖尿病におけるK cell populationは、ウイルス感染、自己免疫説のあるインスリン治療を要する若年型糖尿病と、インスリン治療を要しない成人型糖尿病とに分けて検討されている。若年型糖尿病においてK cell populationは低値を示し、成人型糖尿病では正常群とほぼ同様な値を示すと言われている。

今回のわれわれの成績では、正常群とほぼ一致する値が得られ、特にK cellとの相関はなかつた。最近では免疫遺伝の立場よりアプローチもなされており、この方面からの解析が期待される。

以上のごとく、いまのべた各疾患の病因病態の中で、ADCCがどのように関与しているかは今後の研究をまたねばならないが、最近ADCC活性と、Natural killer cell活性(以下NK活性とする)との異同も論じられ、どうも両者の effector cellは同一で、分化する過程において異なる機能をもつてきたのではないかと推測されている。免疫学的生体防御機構において、K cell, NK cellの役割はますます大きくなつてきていると言えよう。

結 論

ADCC操作に若干の工夫を加え、さらに臨床例について検討を行い、以下の結論を得た。

1) 単層形成を短時間で、より均一に作製するために 5×10^8 個/mlでの単層附着の検討を行い満足できる結果を得た。

2) 慢性肝炎におけるADCC活性は、 6.30 ± 0.91 で、正常群に比べ低い値が得られたが、有意な差は認められなかつた。血清トランスアミナーゼとADCC活性は、同様な推移を示した。

3) 十二指腸潰瘍におけるADCC活性は、 6.33 ± 0.88 で、正常群に比べ低い値を示した。各

病期における ADCC 活性は、血中免疫グロブリン (IgG) の推移と同様に活動期に低下傾向を示した。

4) 胃癌における ADCC 活性は、8.10で正常群に比べ高い値を示した。

5) 成人型糖尿病における ADCC 活性は、7.16±0.85で正常群とほぼ同様な傾向を示した。

6) 以上により ADCC 活性の effector cell である K cell の役割は、病因病態に何らかの働きをしていることがわかった。

文 献

- 1) **Wahlin, B. and P. Perlmann:** Detection of K cell by a plaque assay In: *In vitro Methods in Cell-Mediated and Tumor Immunity* by Blooms, B.R. & Pavid, J.R., Academic Press N.Y. (1976)
- 2) **Möller, E.:** *Science* **147** 873 (1965)
- 3) **Perlmann, P. et al.:** *Advances Immunol* **11** 117 (1969)
- 4) **MacLennan, I.C.H. et al.:** *Immunol* **17** 887 (1969)
- 5) **Schirrmacher, V. et al.:** *J Immunol* **113** 1145 (1974)
- 6) **Scornic, J.C.:** *J Immunol* **113** 1519 (1974)
- 7) **Perlmann, P. and H. Perlmann:** Contactualysis of antibody-coated chicken erythrocytes by purified lymphocyte cell. *Immunol* **1** 229~305 (1970)
- 8) **Takasugi, M. and E. Kein:** A microassay for cell-mediated immunity. *Transplantation* **9** 219~227 (1970)
- 9) **佐々木功一・他:** ヒト末梢血中リンパ球 ADCC 活性の検討. 第16回関東甲信臨床検査技師会講演集 279~281 (1979)
- 10) **銭谷幹男・他:** マイクロプレート法によるヒト末梢血中 kill cell の同定. *医学のあゆみ* **109** 682~684 (1979)
- 11) **上地六男・他:** 十二指腸潰瘍の免疫学的研究 *Gastroenterological Endoscopy* **20** (5)424~430 (1978)
- 12) **銭谷幹男・他:** Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC): クリニカ **6** (9) (1979)
- 13) **Van Oers, M.H.J., R.E.Y. DeGoede and W.P. Zeijlemaker:** Antibody-dependent lymphocytotoxicity. An analysis of effector cell-target cell interactions. *J Immunol* **121** 499~504 (1978)
- 14) **福本陽平・他:** 肝臓 **19** 495 (1978)
- 15) **銭谷幹男・他:** 慢性肝疾患における末梢リンパ球中 K Cell-population—マイクロプレート法による検討. 肝臓 **19** 1188 (1978)
- 16) **相沢良夫・他:** 肝疾患における K Cell 動態について—Proteolytic enzyme 処理による検討. 肝臓 **20** 973 (1979)
- 17) **野々村昭孝・他:** 健常者末梢血リンパ球の培養肝細胞に対する Spontaneous Cell-mediated Cytotoxicity について. 肝臓 **20** (8) 773~781 (1979)
- 18) **小松文夫・他:** 悪性腫瘍, 自己免疫疾患におけるブランク形成法による Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ADCC) の測定. *臨床検査* **24** (3) 337~340 (1980)
- 19) **山村雄一・他:** 腫瘍免疫. *臨床免疫 Suppl* **1** 78~88 (1980)