口腔癌患者における natural killer (NK) 活性に関する研究

田 上 正

Studies on natural killer (NK) activity of oral cancer patients

Tadashi TAGAMI

緒 言

異物を排除し自己の恒常性を維持するためにさまざまな免疫機構が働いている。癌患者のリンパ球が *in vitro* で培養細胞を破壊する現象は cell-mediated cytotoxicity (CMC) と呼ばれ、その免疫学的破壊の機序を解明するモデルとして多くの研究がなされてきた。また最近、健康人や免疫されていない動物にも腫瘍細胞に対して CMC を示す¹⁻⁴⁾ことが示され、その作用は natural killer (NK)¹⁾と呼ばれた。しかも胸腺が欠如した T 細胞機能をもたないヌードマウスに、自然発癌や発癌剤による発癌率が低いこと、しかもこのヌードマウスの NK 活性が非常に高い³⁾ことなどから、NK 細胞が *in vivo* での腫瘍に対する非特異的な一次的な防御機構を担っているのではないかと考えられ、注目を浴びるようになった。

NK 細胞の性格については多くの報告がなされているがまだ明らかでない部分が多い。NK 細胞がリンパ球の中でどの分画に属するかについては、ヒツジ赤血球が T 細胞とロゼットを形成する性質を用いて分画した方法では、T 分画にある⁵⁻⁷⁾、non-T 分画にある⁸⁻¹²⁾、T, non-T 両分画にあると¹³⁾、さまざまな報告があり結論はでない。また、非特異的障害性を示すと考えられていた NK 活性にもある程度の選択性があるらしいことがわかってきた^{14,15)}。

一方、担癌患者においても乳癌^{16,17)}、肺癌^{17,18)}、胃癌¹⁹⁾、膀胱癌^{17,20)}、その他の癌でも数多く研究され、担癌状態では NK 活性が低下しているとの報告が多い。

口腔癌患者の CMC に関しては藤林ら²¹⁻²³⁾および佐藤²⁴⁾が、患者リンパ球の CMC の強さはその担癌状態、予後とおおむね相関し、この CMC に関与する effector

細胞は non-T 細胞であって NK 活性様の障害性を示すが、担癌の初期では T 細胞にも活性があることを示し、さらに和気²⁵⁾は Fc receptor (Fc R) に注目し、NK 活性様の障害は Fc R⁺ 分画にあり担癌の初期での活性は T Fc R⁺ 分画にあるとした。

そこで著者は、口腔癌患者および健康人のリンパ球を用いて特に NK 活性に注目し、T, non-T どちらの分画に強い活性を示すか、担癌状態によって NK 活性がどのような影響を受けるか、さらには外科的手術後、術前に比べてどのような変動を示すか、そして担癌患者における局所での NK 活性の違い等を ⁵¹Cr 遊離試験法²⁶⁻²⁸⁾を用いて検討し、若干の知見を得たので報告する。

研究 方 法

I. 対象

研究対象は、1981年6月より1982年3月までの10か月間に本学第2口腔外科を受診した口腔癌患者のうちから任意に選択した27名である。年齢は22~80歳で、癌の臨床的進行度は1978年の UICC 提案の Stage 分類²⁹⁾に従うと、Stage I はなく、Stage II が13名、Stage III が10名、Stage IV が4名であり、便宜上 Stage I と Stage II を合わせたものを初期癌群（内容的には Stage II の13名）、Stage III と Stage IV を合わせたものを進行癌群（14名）として結果を検討した。また対照として健康人19名についても同様の検討を行った。

II. 標的細胞

標的細胞は K 562 と Ca 9-22 を使用した。K 562 は Lozzio ら³⁰⁾が慢性骨髄性白血病の患者から樹立した細胞で、erythroleukemia cell³¹⁾としてその性状が明らかにされた。Ca 9-22³²⁾は1974年当教室で樹立された歯肉扁平上皮癌由来培養細胞である。K 562 は RPMI 1640 (日水製薬) にペニシリン (100 unit/ml)、ストレプトマイシン (100 μg/ml)、グルタミン (0.3 g/ml) および10%の非働化した仔牛胎児血清 (FCS; GIBCO) を加えた培養液で、Ca 9-22 は Eagle MEM (日水製薬) に同濃度のペニシリン、ストレプトマイシン、グルタミン、FCS を加えた培養液でそれぞれ保持した。

東京医科歯科大学歯学部第2口腔外科学教室
(主任: 榎本昭二教授)

The Second Department of Oral Surgery, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University (Chief: Prof. Shoji Enomoto)

受付日: 昭和57年9月25日

III. effector 細胞

effector 細胞としては末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocytes: PBL), リンパ節細胞 (lymph node cells: LN), および腫瘍組織浸潤リンパ球 (Tumor infiltrating lymphocytes: TIL) を使用した.

1) PBL の分離

i) Unfractionated (Unf) 分画: 被験者の肘正中皮静脈よりヘパリン加注射器で末梢血を採取しその一部をダルベッコリン 酸緩衝液 (PBS (-): 日水製薬) で3倍に希釈し, Conray-Ficoll 液 (比重1.077) 上に静かに重層し, 室温で 400 G, 30分間遠心して中間層の単核細胞分画を採取した. さらにこれを3回洗浄して Unf 分画を得た. 洗浄液はすべて K 562 培養液と同じ組成の RPMI 1640 液を使用した. PBL として NK 活性を測定する場合はこの Unf 分画を使用した.

ii) macrophage-depleted (Mφ-dep) 分画: Unf 分画中のマクロファージを除去するため Lohrman 法³³⁾に準じた処理^{24,25)}を行った. すなわち, 上記ヘパリン加末梢血の残りをプラスチックフラスコ (Falcon 3024) に入れ, carbonyl iron (G.A.F.) を血液 5 ml に対して 0.02 g の割合で加え, 震盪培養器 (Tokiwa) でゆっくり回転しながら 37°C で 60分間反応させた後, RPMI 液で3倍に希釈し Conray-Ficoll 法により carbonyl iron を貪食して比重の増したマクロファージを除き, 中間層のリンパ球を回収して洗浄後 Mφ-dep 分画を得た.

iii) T分画と non-T 分画: T分画, non-T 分画の分離は, Mφ-dep 分画のリンパ球を EN ロゼット法^{8,24,34,35)}により行った. すなわち 1×10^6 /ml のヒツジ赤血球 (日本バイオテスト研究所) 1 ml に対して neuraminidase (Behringwerke AG) 0.1 ml (50単位) を加え, 37°C で 30分間反応させ, 氷水中で5分間冷した後 PBS で3回洗浄して得た EN に対して, リンパ球を細胞比で 100:1 の割合で混合し, 37°C で 15分間恒温槽中で培養した後 150G で 5分間遠心し, さらに氷水中で 60分間反応させた. この反応は FCS 中において行った. 反応終了後ペレットを再浮遊させ, Conray-Ficoll 上に重層し, 400 G で 30分間遠心してペレットのロゼット形成細胞の T 細胞分画と, 中間層の非ロゼット形成細胞の non-T 細胞分画とに分離した. ヒツジ赤血球を溶血させるため, NH₄Cl 処理³⁶⁾を行った. non-T 分画にも条件を同じくするために同様の処理を行い, その後3回洗浄して T 分画と non-T 分画を得た.

2) TIL および LN の分離

TIL は Svennevig ら³⁷⁾の方法を一部改変して行った. すなわち, 口腔癌手術時に切除した腫瘍組織を洗浄液で洗浄した後, 結合組織, 脂肪組織を取り除き乾燥させないように少量の培養液を加えながらハサミで細切を行い, 培養液を十分に加えてスターラーで 4°C で 1時間攪拌した後, ガーゼで濾過し, 濾液を Conray-Ficoll

に重層し, 400 G, 30分間遠心して中間層に得られる細胞を洗浄し TIL として用いた.

LN は, 口腔癌患者で頸部リンパ節廓清手術施行時に切除したリンパ節のなかで転移のないリンパ節を, TIL 採取法と同様にハサミで細切を行った後すぐにガーゼで濾過し, その濾液を conray-Ficoll に重層し, 遠心して中間層に得られた細胞を LN として用いた.

IV. ⁵¹Cr 遊離試験法

NK 活性の測定は ⁵¹Cr 遊離試験法で行った. まず標的細胞に対する標識方法は, 標的細胞 1×10^6 個に対して ⁵¹Cr (Na₂CrO₄, New England Nuclear; Code No. NEZ-030 S) 100 μCi/ml に調整した標識用培養液 1 ml を加え 37°C で 1時間, ときどきよく混和させながら培養した. 標識用培養液は洗浄液と同じ組成の RPMI 1640 液を使用した. Ca 9-22 は付着細胞であるため標識前に 0.1%トリプシン (持田製薬) で処理をした後, 3回洗浄して単細胞浮遊液を得, トリパンブルー染色による色素排除試験³⁶⁾を行って生存細胞数を算定した. K 562 は浮遊細胞であるのでトリプシン処理をせず, トリパンブルー色素排除試験を行って 1×10^6 個の生存細胞を得た. 両標的細胞は, 標識終了後3回洗浄して試験培養液に 1×10^5 /ml の濃度になるように調節し浮遊させた. 次に U 型マイクロプレート (NUN-CLON, NUNC 社) の各 well を実験群として, effector 細胞 5×10^6 /ml を含む試験培養液 100 μl と標的細胞 1×10^5 /ml を含む試験培養液 100 μl を各 well に加え, 標的細胞; effector 細胞 (T: E ratio) = 1:50 に調節した後, プレートに 200 G, 10分間遠心して細胞の接触を増大させ, 5%, CO₂ 37°C で 6時間および 18時間反応させた. 試験培養液は洗浄液と同様の RPMI 1640 液を使用した. 反応終了後培養上清を Titertek の上清採取システムを用いて集めた. すなわち, 先端に円形の濾紙のついた円筒形の Titertek 上清吸着材を各 well の上からゆっくり押し込み上清を濾紙を通して吸収させ, 濾紙は well の底に残るため細胞は吸着材に吸着されず, その吸着材だけをチューブ (栄研チューブ 1号) に入れ, 上清中の死細胞より放出されたアイソトープの量を well-type gammer scintillation counter (Aloka: Auto well gammer system) によって測定した. 各 well 中の上清中に放出されたアイソトープの放射活性から, 次式によって % cytotoxicity を計算して NK 活性とした.

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{experimental release}}{\text{maximum release}} - \frac{\text{spontaneous release}}{\text{spontaneous release}} \times 100$$

ここで

maximum release: 最大遊離で標的細胞の全標識 cpm 値

spontan. release: 自然遊離で標的細胞のみの well 内

で effector 細胞の影響を全く受けないで自然に遊離された cpm 値 experimental release: 標的細胞に effector 細胞を作用させた実験群の上清中に遊離された cpm 値を意味するが、これらの測定には実際には最大遊離を測定する well には effector 細胞浮遊液の代わりに、1N HCl 100 μ l を、自然遊離を測定する well には試験培養液のみ 100 μ l を入れた。また、実験値のばらつきが避けられないので、実験群は二重試験法、最大遊離群と自然遊離群は三重試験法で行った。

研究結果

I. 実験条件としての標的細胞数の検討

至適の実験条件を検討するため、まず健康人3名の末梢血リンパ球、すなわち PBL を用いて T: E ratio をいろいろ変化させ、1 well 内にまく標的細胞数を 1×10^3 個、 2×10^3 個、 5×10^3 個、 1×10^4 個の4段階に分けてそれぞれのNK活性を測定した。標的細胞をK 562にした場合の結果は図1 Aのごとくで、 1×10^4 個の場合おのこのNK活性は若干のばらつきはあるが、だいたいのdose-response curveを描いたが、wellあたりの標的細胞数が少ない場合は必ずしもそのような傾向を示さなかった。Ca 9-22の場合は図1 Bのごとく細胞数をwellあたり 1×10^4 個にした場合、T: E ratioによらずその障害性は大体一定の値をとる傾向にあったが、標的細胞数が少ない場合にはT: E ratioを変化させた時のばらつきが大きかった。表1はおのこの実験における最大遊離と自然遊離のcpm値、および最大遊離に対する自然遊離の値である。表のごとく、標的細胞数を多くするほど、自然遊離の割合が少なくなり、それに伴って障害性のばらつきも少なくなる傾向にあった。また誤差をできるだけ少なくするためにも最大遊離のcpm値が大きい方が望ましく、そのためには細胞数が多い方が良いが、採取できるリンパ球数にも限度があり、細胞数の増加に伴う培養条件の悪化などを考慮に入れて、標的細胞数をwellあたり 1×10^4 個を採用することにした。

図 1A 標的細胞数 (1×10^3 , 2×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 /well) に対して E: T ratio を変化させたときの NK 活性

図 1B 標的細胞数 (1×10^3 , 2×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 /well) に対して E: T ratio を変化させたときの NK 活性

表 1 K 562 と Ca 9-22 における標的細胞数と最大遊離 (cpm), 自然遊離 (cpm)

標的細胞 細胞数/well	K-562			Ca 9-22		
	最大遊離	自然遊離	自然遊離 最大遊離	最大遊離	自然遊離	自然遊離 最大遊離
1×10^3	414.0	236.4	57.1%	315.8	127.2	40.3%
2×10^3	634.0	348.7	55.0%	424.1	184.0	43.3%
5×10^3	1228.5	442.3	36.0%	980.1	367.5	37.5%
1×10^4	2318.0	579.5	25.0%	1183.0	420.0	35.5%

図 2 E: T ratio を変化させたときの NK 活性の経時的変化

表 2 effector 細胞を4分画にわけたときの NK 活性

	K 562				Ca 9-22			
	6 時間 assay		18時間 assay		6 時間 assay		18時間 assay	
	症例数	% cytotoxicity (平均値±S.D.)	症例数	% cytotoxicity (平均値±S.D.)	症例数	% cytotoxicity (平均値±S.D.)	症例数	% cytotoxicity (平均値±S.D.)
Unf	11	44.0±21.0	8	71.5±22.7	10	10.9± 7.8	7	14.2± 8.0
Mφ-dep	11	40.4±25.6	8	60.3±30.1	10	10.3± 7.3	7	10.4± 8.0
T	11	3.6± 3.8	8	23.6±12.0	10	2.6± 4.2	7	2.8± 4.6
non-T	11	13.4±12.4	5	30.4±15.6	10	4.3± 3.7	6	10.6± 7.9

II. NK 活性の time course と T: E ratio の検討

次に反応の time course を検討した. すなわち健康人4名から採取した PBL を用いて, T:E ratio を1:25, 1:50, 1:100, 1:200, としておのおのの NK 活性を, 6時間, 12時間, 18時間後に測定した. 図2は% cytotoxicity の測定値をその4例の平均値でプロットして示した. K 562 は T: E ratio でみれば effector 細胞を増加すればNK 活性も順次増加を示し, また時間でみれば, その障害性は短時間で起こり6時間でほぼプラトーに達した. 一方, Ca 9-22 の場合は effector 細胞を増加させてもその障害性はほとんど変化せず, しかもその値は K 562 に比較して低いものであった. また, 時間が経過するに従って低いながらも少しずつ高い障害性を示す傾向がみられた. 以上の結果より K 562 は6時間 assay が, Ca 9-22 は18時間 assay が適当であると思われたが, 両者を比較するために両方の細胞に対して6時間と18時間の2回の時点で測定することにした. また T: E ratio を変えてもその障害性にほとんど差がない

こと, K 562 では T: E ratio が 1:50 で十分に障害性が現れることなどから, T: E ratio を1:50 に決めて以下の実験を施行することにした.

III. effector 細胞の分画による NK 活性の検討

表2および図3は, 健康人および癌患者の PBL を用いて, そのリンパ球を Unf, Mφ-dep, T, non-T 分画に分けた時のおのおのの NK 活性を示したものである. 図中の点は各サンプルの NK 活性を示したもので, 同一検体における各分画の変動は実線で結んで示し, 太い横棒は平均値, 縦の細い実線は標準偏差の範囲を示している.

Unf 分画と Mφ-dep 分画を比較すると, K 562 の6時間 assay では Unf 分画で44.0±21.0%, Mφ-dep 分画で40.4±25.6%と有意の差はみられなかったが, 若干 Unf 分画の方が高い値を示した. この傾向は K 562 の18時間 assay, Ca 9-22 の6時間 assay および18時間 assay のいずれの場合にもみられたが, 有意差はなかった.

図 3 各分画における NK 活性の比較

図 4 健康人群と癌患者群の NK 活性の比較

表 3 健康人群と癌患者群の NK 活性

	K 562				Ca 9-22			
	6 時間 assay		18時間 assay		6 時間 assay		18時間 assay	
	症例数	% cytotoxicity (平均値±S.D.)	症例数	% cytotoxicity (平均値±S.D.)	症例数	% cytotoxicity (平均値±S.D.)	症例数	% cytotoxicity (平均値±S.D.)
健康人群	19	46.8±14.6	18	62.5±17.4	19	9.4± 9.3	18	11.5±12.1
初期癌群	13	51.0±16.3	10	61.4±26.9	10	11.3± 4.9	10	11.9±10.0
進行癌群	14	33.7±13.7	10	47.6± 9.1	10	6.2± 5.7	10	13.5± 8.5

次に T 分画と non-T 分画の NK 活性を比較すると、K 562 の 6 時間 assay で T 分画は $3.6 \pm 3.8\%$ 、non-T 分画は $13.4 \pm 12.4\%$ で危険率 5% で non-T 分画の方が有意に高い値を示した。また Ca 9-22 の 18 時間 assay でも T 分画 $2.8 \pm 4.6\%$ 、non-T 分画 $10.6 \pm 7.9\%$ で危険率 5% で有意に non-T 分画が高い値を示した。同じ傾向はほかの assay でもみられたが、K 562 の 18 時間 assay ではばらつきが多く、Ca 9-22 の 6 時間 assay では両分画ともほとんど障害性を示さず、いずれも有意差

はみられなかった。Unf 分画、Mφ-dep 分画と T 分画、non-T 分画との比較は、処理の仕方が違うので (T、non-T 両分画には NH_4Cl 処理がしてあるが、Unf、Mφ-dep 分画にはしてない)、単純に比較はできないが、T、non-T 分画の両分画の NK 活性は、Unf、Mφ-dep 分画に比べて非常に低い値を示した。

IV. 口腔癌患者および健康人対照の NK 活性

口腔癌患者の PBL の NK 活性は、患者群を初期癌群、進行癌群の両群に分け、健康人群対照の PBL の

NK 活性とともにその結果を図 4 にプロットして示した。また表 3 は各群の平均値を示したものである。

健康人群と初期癌群とを比較すると、K 562 の 6 時間 assay ではそれぞれ平均 $46.8 \pm 14.6\%$ 、 $51.0 \pm 16.3\%$ となり、初期癌群の方が若干高い傾向はあるが有意差はみられなかった。ほかの assay でも同様の傾向がみられたが、いずれの場合も有意差はみられなかった。また健康人群と進行癌群とを比較すると、K 562 の 6 時間 assay で進行癌群の NK 活性は $33.7 \pm 13.7\%$ と健康人群に比べて危険率 1% で有意に低い値を示した。ほかの assay では Ca 9-22 の 18 時間 assay で進行癌群の平均値は $13.5 \pm 8.5\%$ で、健康人群の $11.5 \pm 12.1\%$ より若干高い値を示したが有意差はみられなかった。ほかの 2 つの assay では、進行癌群が低下している傾向があったが有意差はなかった。また癌患者群のなかで初期癌群と進行癌群を比較すると、K 562 の 6 時間 assay で危険率 1% で有意に進行癌群の方が低い値を示した。また Ca 9-22 の 18 時間 assay では若干進行癌群の方が高い値を示したが有意差はなく、ほかの 2 つの assay では K 562 の 6 時間 assay と同じ傾向がみられたが有意差はなかった。

以上をまとめると、K 562 の 6 時間 assay では進行癌群の NK 活性は、健康人群、初期癌群に比べて有意に低下していることが明らかであった。健康人群と初期癌群とでは有意差はなく、初期癌群の方が若干高い傾向にあった。ほかの assay では同様の傾向がみられたが、有意差はみられなかった。

図 5 PBL, LN, TIL における NK 活性の比較

図 6 初期癌群における手術前、手術後の NK 活性の経時的変化

図 7 進行癌群における手術前, 手術後の NK 活性の経時的変化

表 4 手術前, 手術後の NK 活性の経時的変化

	Stage	術前 %	術 前 放射線 %	術後2週		術後1か月		術後3か月		術後6か月		予 後
				NK %	増加率 %	NK %	増加率 %	NK %	増加率 %	NK %	増加率 %	
K. H.	II	52.5	34.0	—	—	18.2	—65.3	37.8	—28.0	—	—	Ao
Y. N.	II	49.5	—	23.3	—52.9	25.0	—49.5	25.8	—47.9	—	—	Ao
M. T.	II	50.6	—	16.4	—67.6	28.9	—42.9	45.3	—10.5	—	—	Ao
U. N.	II	48.5	—	19.3	—60.2	32.1	—33.8	38.3	—21.0	—	—	Ao
A. Y.	II	17.0	—	10.5	—38.2	31.3	84.1	19.5	13.5	—	—	Ao
S. S.	III	48.0	—	19.8	—58.8	29.1	—39.4	15.1	—68.5	34.5	—28.1	Ao
F. M.	III	16.1	—	10.2	—36.6	19.1	18.6	26.4	64.5	21.4	32.9	Ao
K. S.	III	40.8	—	—	—	46.8	14.7	40.5	—0.7	—	—	Ao
H. O.	IV	23.1	15.6	—	—	12.8	—44.6	9.9	—57.1	20.3	—12.2	Ao
S. F.	IV	33.5	—	18.3	—45.5	20.3	39.4	4.9	—85.4	7.5	—77.6	Ac
N. T.	IV	21.5	7.8	5.2	—75.8	11.4	—47.0	13.2	—38.6	3.1	—85.6	Ac
S. U.	IV	18.5	—	6.8	—63.2	7.4	—60.0	13.2	—28.6	—	—	Ac

V. 癌患者における PBL, LN, TIL の NK 活性の比較

図5は口腔癌患者で, 口腔原発腫瘍の切除術を行った症例から TIL, 頸部リンパ節廓清術を施された患者の LN の NK 活性を, 同一患者から同時に採取した PBL の NK 活性とを同時に測定した結果で, 各群に分けて比較し, 同一患者の検体を実数で結んだものである。

K 562 の 6 時間 assay での平均値は PBL 45.7%,

LN 10.1%, TIL 3.6%と明らかに LN, TIL の NK 活性は PBL よりも低い値を示し, はかのいずれの assay においても同様の結果が得られた。TIL は3例のみであるが, 同一患者の LN と比較すると有意差はなく, いずれも低い値を示した。またおのおの個人の値を比較しても, Ca 9-22 の 6 時間 assay の 1 例を除いて, すべての患者において PBL に比べて LN での NK 活性の低下が認められた。

VI. 口腔癌患者の治療前後の時間的経過による

NK 活性の変動について

図6, 7は担癌患者の PBL の NK 活性を, 初診時, 術前照射時, 外科的切除手術後2週後, 1か月後, 3か月後, 6か月後に同一患者を経時的に追跡して測定した結果であり, その個々の測定値は表4に示した. assay はすべて K 562 の6時間 assay で行った. 図において術後の検索時の臨床状態を, Ao すなわち臨床的に腫瘍が認められないものは○印で, Ac すなわち明らかに腫瘍の残存あるいは再発の認められるものは☆印で, Ax すなわち Ac か Ao かいずれかが明らかでないものは△印で示した. また, 前回検索時よりも NK 活性が上昇したものを実線で, 低下したものを点線で示した. さらに, 術前と比べて NK 活性の増減の程度を表すために, 便宜的に次式によって増加率を求めて表4に表した.

$$\text{増加率 (\%)} = \frac{b - a}{a} \times 100$$

a : 術前の NK 活性 (% cytotoxicity)

b : 検索時の NK 活性 (% cytotoxicity)

したがって表において正の増加率は術前より NK 活性が上昇していることを, また負の増加率は低下していることを示している.

結果は, 初期癌群においては術前に比べて術後2週目に著明な低下が4例中全例にみられた. その後1か月後には2週目に比較して NK 活性の上昇がみられた. さらに3か月後には1例を除いてさらに上昇がみられ, その1例も術後2週目に比較すると上昇を示していた. また進行癌群においても, 術後2週目に著明な低下がみられ, その後1か月後には5例全例に上昇がみられた. ところが3か月以後は患者によってさまざまな傾向がみられた. 患者の予後と比較してみると, Ao の患者は12例中9例であるが, 術後2週目の一次的低下からの回復がよく, その増加率も平均 $-11.3 \pm 24.2\%$ であった. 一方, Ac の患者は12例中3例であったが, 術前に比較して平均 $-63.9 \pm 24.2\%$ と低い値であった. さらに Ac の患者の NK 活性は Ao の患者に比べて低い値を示した.

考 察

腫瘍に対する免疫反応は主として細胞性免疫反応によるものであり, この反応による腫瘍細胞破壊にはいくつかの機序が考えられている. 1つは, 腫瘍抗原を認識して誘導された細胞障害性 T 細胞 (CTL)³⁹⁾ が直接その腫瘍細胞を破壊する現象であり, 腫瘍細胞破壊の中心的役割を担っている. また腫瘍細胞の表面抗原に対する特異抗体を介して細胞障害性が働く抗体依存性細胞障害 (ADCC)⁴⁰⁾ があり, その effector 細胞は K 細胞と呼ばれ

ている. 一方, これらに対して健康人や腫瘍抗原に免疫されていない動物から採取したリンパ球が, 腫瘍細胞に障害性を示す NK 作用があり, その担当細胞は NK 細胞と呼ばれている. この現象は Nunn ら⁴¹⁾ がマウスの系において, ウイルス誘発白血病の研究中に腫瘍マウスよりもコントロールとしておいた非腫瘍マウスに高い障害性があることを見出し, これが常に起きる現象であることを報告した. これに端を発しこのような免疫学的未処置のリンパ系細胞が *in vitro* で細胞障害性を示すことについての多くの研究がなされ, またヌードマウス等による *in vivo* での役割についてもその重要性が示唆されるようになった. また, その他にマクロファージによる癌細胞破壊⁴²⁾もある. しかもこれらの機構はそれぞれ単独に作用するのではなく, 密接に関連しながら腫瘍細胞破壊に向かって働いているのではないと思われる. NK 細胞に関しても, K 細胞と同じかあるいは重複する細胞集団に属しているのではないか⁴³⁾, あるいは NK 細胞は T 細胞の前駆細胞ではないか⁴⁴⁾等, それらの共通性についても論議されている.

ヒトにおいて *in vivo* における NK 細胞の役割については, 最近 Chediak-Higashi 症候群の患者に NK 活性が欠如していること⁴⁵⁾が認められ, また担癌生体においても重要な役割を演じていることがわかりつつあるが, しかしまだその実体については不明な点が多い. 本研究は, 健康人や口腔癌患者から採取したリンパ球を用いて, この NK 活性について *in vitro* で検討したものであるが, その結果について若干の考察を行った.

I. 研究方法について

CMC の検索方法は, Takasugi ら⁴⁶⁾によって開発され, 当教室でも数年間行われている²¹⁻²⁵⁾ microtest plate による microcytotoxicity assay (MCA) や種々のアイソトープを用いた方法がある. アイソトープ法は本研究で用いた ⁵¹Cr 遊離試験法のほかに, ³H-ウリジン⁴⁷⁾, ³H-プロリン⁴⁸⁾, ³H-チミジン⁴⁹⁾, ¹²⁵I-UdR⁵⁰⁾, ⁸⁶Rb⁵¹⁾を用いた方法等がある. NK 活性の測定においては標的細胞に選択性があり一般的にはリンパ系細胞が多く用いられることや, その反応が短時間で現れることなどから使用されるアイソトープは限定されてくる. ⁵¹Cr 遊離試験法は1968年に, Brunner ら²⁶⁾が用いて以来多くの人々が使用している方法で, 最近ではリンパ系の細胞に限らず付着細胞にも用いられている. ほかのアイソトープを利用する方法では, ³H-ウリジン法は標的細胞が RNA 合成の高い細胞に限られ, リンパ系細胞ではあまり用いられていない⁴⁷⁾. また一部生細胞で再利用されるともいわれている. ³H-プロリンや ³H-チミジンは, 付着性の細胞に適しており, しかも24~72時間の長時間 assay に適している^{48, 49)}. ⁸⁶Rb は多数の effector 細胞が残存している場合に ⁸⁶Rb の取り込みにみせかけの増加をみることなどの欠点がある⁵¹⁾. したがって, これらのアイソ

トープは、NK 細胞の様な細胞障害性が短時間で起こることが特徴である場合はあまり利用されていない。また ^{125}I -UdR は ^{51}Cr 遊離試験法の欠点を補うべく、長時間でも自然遊離が少なく、しかも少ない effector 細胞を用いた場合の微量測定に多くは用いられる⁵⁰⁾が、操作が煩雑であるのが難点である。したがって比較的操作が簡便でしかも短時間 assay に適しており、多くの検体を一度に処理できることなどから、 ^{51}Cr 遊離試験法を用いて本実験を行った。この実験法の原理は Cr^{6+} イオンとして細胞膜を通して細胞質に入り、還元されて Cr^{3+} として細胞質内分子として比較的長時間保持され、細胞質内分子の放出が起こるような十分な障害を受けると ^{51}Cr が放出されること⁵²⁾にある。本研究においては遊離細胞の K 562 とともに付着細胞である Ca 9-22 を用いたが、付着細胞に ^{51}Cr 遊離試験法が適しているかどうかはいまだ問題は残るが、K 562 と比較対照して NK 活性に対する選択性を知る意味においてもこの実験法を用いた。

この ^{51}Cr 遊離試験法で特に注意を要するのは自然遊離をいかに低く抑えるかということである。自然遊離は effector 細胞を加えないで標的細胞単独培養時に自然に放出される ^{51}Cr の量であるが、自然遊離が大きくなると、実際に NK 細胞により障害され放出される ^{51}Cr の量との差が明らかでなくなり、計算上 NK 活性の低下となって現れ実験誤差が大きくなる。自然遊離を低く抑えるためには、まず細胞が新鮮で生存率の高いものを使用する必要があるが、本実験ではその生存率はすべて90%以上であり問題は無いと思われる。K 562 と Ca 9-22 とを比較すると表1に示すように Ca 9-22 の自然遊離が高い場合が多かった。この原因として ^{51}Cr 標識中および assay 時は、Ca 9-22 は培養液中に浮遊した状態にあり、継代培養時に付着細胞として活発な増殖をしているときとは違った性質をもっていることや、assay 前に行うトリプシン処理の影響で細胞がかなり弱った状態にあることなどが考えられる。いずれにしても付着細胞に対する NK 活性の測定には十分な検討が必要であると思われる。また NK 活性測定の問題点に、同一個人における実験のたびの変動がある。図8は10回の実験においてコントロールの意味で1人の NK 活性を毎回測定した結果である。図にみられるように、ある値でまともにはみられたものときにより明らかな変動もみられた。この変動の原因として、被験者の NK 活性の動揺、標的細胞、effector 細胞側の要因、実験操作時の何らかの要因等が考えられる。同様の現象は Pross⁵³⁾、押味ら⁵⁴⁾も指摘しており、実験ごとの変動が個人間で平行していることから、個人の NK 活性の変動ではなくそれ以外の理由によるのではないかとしている。標的細胞側の要因^{54,55)}としては、継代培養時、培養液交換後数日経過した培養液が黄変したり、過剰増殖した細胞を標

図8 単一被験者における実験日の違いによる NK 活性の変動

的細胞として用いると NK 感受性の低下がみられることなどから、活性の低下した細胞では培養条件の変化などによる自然遊離の増加が考えられ、その変動が個人の NK 活性の変動に反映している可能性が考えられる。また標的細胞の cell cycle の違いにより NK 感受性が異なるかもしれない。effector 細胞側においては、FCS による NK 活性の増強⁵⁶⁾や 37°C 、2時間放置すると有意に活性を失う³⁾ ことなどから、細胞の状態や環境の変化も NK 活性に影響しているものと考えられる。実験操作上で注意すべきは ^{51}Cr の使用時期である。 ^{51}Cr は半減期が28日と非常に短いため新鮮でない ^{51}Cr を使用すると標識されるアイソトープの量が少なくなり、十分な最大遊離の値が得られなくなるため、本研究では購入後2週間以内に使用するようにした。また本研究で用いた Titertek 上清採取システムでは、1 well あたりの培養液が $200\mu\text{l}$ 以上では実験値に変動がでてくるという説⁵⁵⁾もあるが、本研究では比較的長い18時間 assay も行っているため、培養条件も考慮に入れて 1 well あたり $200\mu\text{l}$ で実施した。個人における NK 活性の変動は以上のような種々の原因が影響しあっていると考えられるが、これに対して NK 活性を補正する方法⁵⁴⁾もあるがまだ一般的でなく、また被験者自身の NK 活性の動揺も全く否定はできないので、明らかに実験誤差と思われ、原因がはっきりする場合は棄却し、その他の場合は補正は行わなかった。いずれにしても NK 活性を ^{51}Cr 遊離試験法を測定する場合、ささいな実験操作の変化が測定値の変動に反映する場合が多く十分に注意しなければならないと思われる。

II. 研究結果について

1) NK 活性の測定条件とその機序

本研究で標的細胞として使用した K 562 は NK 細

胞に対して高い障害性が示され、最も多くの NK 細胞と結合するといわれており、ヒトの NK 活性測定には最もよく使用されている⁵⁷⁾。⁵¹Cr 遊離試験法における実験条件は、標的細胞数 $1 \sim 2 \times 10^4$ 個に対して T: E ratio が 1: 25 から 1: 100 で用いられており、本実験も実験条件の検討結果から標的細胞数 1×10^4 個、T: E ratio 1: 50 の条件で実施した。付着細胞系の assay もほぼ同様の assay 系が多いが、最も違うところはその assay 時間である。本研究では標的細胞として K 562 と Ca 9-22 を用いたが、Jondal ら⁹⁾は、同一被験者に対して K 562 は 1 時間後に 40%、5 時間後に 60%、17 時間後に 70% の障害性を示し、NK 反応は短時間で起き 5 時間後からはほぼ横ばい状態であるが、Raji 細胞を用いると、1 時間後はほとんど 0 であり、5 時間後に 10%、17 時間後に 40% と徐々にその障害性が高まることを示し、細胞の感受性に違いがあることを示唆している。本研究においてもほぼ同様に図 2 に示すごとく、K 562 は 6 時間でほぼ横ばい状態に達し、Ca 9-22 は 18 時間まで徐々に障害を受け、異なる time course を描いた。この基礎実験より K 562 では 6 時間 assay、Ca 9-22 では 18 時間 assay が適当であると考えた。また K 562 が effector 細胞の増加に伴いその障害性が高まるのに対し、Ca 9-22 は effector 細胞を多くしても障害性は高くなり常に低い値を示した。この二つの大きな違い、すなわち time course における違いと T: E ratio の変化に伴う対応の違いは、標的細胞自身の NK 細胞に対する感受性の違いだけでなく、NK 細胞側にもある程度の選択性があるのではないかと考えられる。NK 細胞の選択性を研究する方法は、標識されていない種々の標的細胞を加えることによってどれだけ NK 活性が抑制されるかを調べる cold target inhibition による crosscompetition assay⁵⁸⁾ が主に用いられている。NK 細胞の選択性はマウスの系で盛んに行われ、その認識抗原は C 型ウイルス抗原ではないか³⁾といわれている。ヒトの場合でもある程度の選択性があること^{14,15)}が示唆されているが、少なくとも NK 細胞は標的細胞上に表現されるおのおの異なった標的構造に対するレセプターをもち、しかも NK 細胞はおのおの異なったレセプターを保有していると考えられる。つまり Ca 9-22 の表面には、NK 細胞のレセプターに対する標的構造が非常に少ないか、あるいは NK 細胞集団の中に Ca 9-22 の標的構造に対するレセプターをもっている細胞が少ないのではないかと考えられる。しかし、effector 細胞を増加させてもその障害性があまり変わらないことにより、Ca 9-22 細胞表面には NK 細胞に対する標的構造が少ないのではないと思われる。実際、この標的構造は分子量 140~240 K の糖蛋白が関与していること⁵⁹⁾、また K 562 を人工的に分化させて膜構造を変化させると NK 細胞に対する抵抗性が獲得されること⁶⁰⁾などは、この認識機構を支持

するものである。ところが最近マウスの系で、NK 細胞の感受性を決めるのはその認識段階の相違ではなく、認識から溶解への過程で NK 抵抗性の細胞はその溶解機構に逆らう機構をもっていることが示され⁶¹⁾、必ずしも標的構造によるものではないという説もあり、この NK 細胞における選択性の問題はさらに検討が必要であると思われる。いずれにしてもこの障害性は、NK 細胞に対する認識、結合にはじまり、次に細胞障害の引き金が起こり、最後に標的細胞破壊が起きるという段階が考えられ、しかもその認識から破壊まで非常に短い時間で起きることが特徴である。Ca 9-22 に対する障害性が K 562 に比べて遅く起きるというこの時間的差は Ca 9-22 の NK 抵抗性だけでなく、作用している effector 細胞にも違いがあるのではないかと考えられる。藤林ら^{21~23)}は標的細胞に同じ Ca 9-22 を用いて、MCA で 48 時間後にその CMC を測定し、その CMC に関与する細胞は、allogeneic な抗原に対する CTL の誘導には少なくとも 5~7 日の培養が必要であること、培養条件の悪化に伴う細胞の死滅はコントロール群に CMC をほとんど示さない分画があるので否定されることなどから、少なくともその一部は NK 細胞によるものと考えられるとしている。しかし、*in vitro* でリンパ球の混合培養を行って活性化されたリンパ球が、T-24 (膀胱癌由来株化細胞) に対して培養前では障害性を示すのに 16~18 時間必要とし、その障害性は低かったが、培養後は 4 時間で高い障害性を示し、しかもその培養は allogeneic な CTL が誘導されると思われるよりも短い 3 日間培養で障害性をもつ細胞が誘導できる⁶²⁾ことや、NK 活性のほとんどないリンパ球を FCS で培養すると 4~5 日で NK 活性を示すようになる⁶³⁾こと等から、*in vitro* で培養されたリンパ球が新たに NK 活性を示し始めるものと思われる。つまり NK 細胞前駆細胞が培養によって CTL とは性質の違う活性化された NK 細胞となって障害性を示すものと考えられる。本実験では培養時間は 6 時間および 18 時間と比較的短いので、あまりその影響はないかもしれないが、*in vitro* で活性化された NK 細胞の存在も全く否定できないと考えられる。いずれにしても標的細胞の違いによる障害性の違いに関しては多くの問題が含まれており、今後さらに検討する必要があるのではないかと考える。

2) 分画における NK 活性の比較

NK 細胞がどの分画に属しているかについてはいろいろ議論のなされているところであり、いまだにはっきりとした結論はでていない。本研究ではリンパ球を carbonyl iron 処理により Mφ-dep 分画を作り、さらに En ロゼット法により T 分画と non-T 分画を作り NK 活性を測定して NK 細胞がどの分画に属するかを検討した。

結果は図 3 に示すごとく、Unf 分画と Mφ-dep 分画

と比較してもほとんど差がなく、マクロファージが直接標的細胞を障害する可能性や NK 細胞に作用してその障害性を高める可能性は少ないと考えられた。マクロファージが *in vitro* で活性化されて細胞障害性を示すまで 24~36 時間必要である⁶⁴⁾との説があるが、本実験のように 6~18 時間の短時間 assay ではその影響は少ないと思われる。しかし NK 活性がインターフェロンで増強される⁶⁵⁾ことはよく知られており、マクロファージもインターフェロンを誘導する一つの因子であることから、*in vivo* の NK 作用に対する影響は無視できないと思われる。たとえばマウスで、あらかじめインターフェロン誘導物質である poly I.C. で NK 活性を高め、*in vitro* で carbonyl iron 処理をしてマクロファージを取り除いても NK 活性は変わらないが、*in vivo* でマクロファージをシリカ等で抑制しておくと NK 活性も抑制される⁶⁶⁾ことなどから、担癌生体でもインターフェロンを介したマクロファージの関わりは考慮される必要があるであろう。

次に T 分画と non-T 分画についてであるが、マウスでの NK 細胞は胸腺非依存性、表面免疫グロブリン陰性で、T 細胞あるいは non-T 細胞とは異なることが示され、ヒトでも non-T 細胞とする説が多い。Devries ら⁸⁾は melanoma を標的細胞とした MCA で non-T 分画に、Jondal ら⁹⁾は K 562 で ⁵¹Cr 遊離試験法で non-T 分画に、Bakács ら¹⁰⁾は sarcoma で ³H-ブロン法で non-T、non-B で便宜的な表面マーカーをもっていない null cell、Takasugi ら¹¹⁾は non-T、non-B 分画の N cell であるとしている。一方 West ら⁵⁾は K 562 に対する ⁵¹Cr 遊離試験法でヒツジ赤血球に対して低親和性 T 分画に NK 活性を示す細胞の多いことを示した。この細胞分画はヒツジ赤血球とリンパ球 100:1 の割合で、4°C でロゼットを形成させて得られる分画であり、Bolhuis ら⁷⁾もこれと同様の結果を得ている。しかし Eremin¹²⁾はヒツジ赤血球とロゼットを形成する分画を除いてもその NK 活性が減少しないことより non-T 分画に NK 細胞があると、本研究でも non-T 分画が T 分画より高い活性を示した。

本実験ではロゼット形成後その赤血球を溶血させるために、NH₄Cl 処理を行ったが、その処理の仕方にはロゼットを形成させたまま反応させる方法や^{5,6)}、蒸留水による hypotonic shock によって処理する方法¹²⁾等がある。effector 細胞を NH₄Cl 処理を行うと NK 活性が低下するという説¹²⁾もあるが、Bakács ら¹⁰⁾は NH₄Cl 処理によっても NK 活性は影響を受けず、しかも結果は non-T 分画に高い活性を示したとしている。本実験も同様であったが、non-T 分画、T 分画のいずれもが Unf 分画、Mφ-dep 分画よりも低い値を示しているの、何らかの影響、特に T 分画側にその影響が強くて

3) 担癌患者における NK 活性

担癌患者の NK 活性に関して多くの報告がなされている。Cannon ら¹⁶⁾は乳癌患者を対象として、K 562 と G 11 (乳癌由来の培養細胞) に対する NK 活性は相関し健康人に比べて高い値をとるとし、Perلمان ら²⁰⁾も膀胱癌で同じ結果を示した。しかし Pross ら¹⁷⁾は肺癌、乳癌、結腸癌、喉頭癌等多くの種類の癌患者を対象にして癌患者の NK 活性の低下を示し、また Eremin ら⁶⁷⁾は Stage I、II の手術可能な患者は健康人群と同じであったが、Stage が進むと低下するとし、Vose ら¹⁸⁾も肺癌患者でも同様の結果を示した。このように腫瘍臓器等の違いによって結果は一致していないが、癌患者に NK 活性の低下がみられるとした報告が多い。本研究の結果も K 562 の 6 時間 assay による NK 活性で、健康人群に比べて進行癌群に有意の低下がみられた。

なぜ担癌患者で NK 活性が低下しているかに関してはよくわかっていないがいくつかの理由が考えられる。まず第 1 に担癌患者自身の非特異的免疫能の低下が考えられる。特に進行癌群においては、腫瘍の増大に伴い全身的な栄養不良の状態に陥り、個体の免疫能は大きな影響を受けるであろう。口腔癌患者においても CMC²¹⁻²⁵⁾、リンパ球幼若化反応⁶⁸⁾、PPD 皮内反応⁶⁹⁾、MLC 反応⁷⁰⁾等において免疫能の低下が示されている。また高齢者に癌が多いこと、しかも高齢者の一般的免疫能も低下していることなども関連づけられるかもしれない。第 2 に血清中の抑制因子の影響、たとえばマウスにおいて NK 細胞が標的細胞を認識し結合する機構をプロスタグランジンなどが抑制する⁷¹⁾ということや、NK 細胞に対する suppressor 細胞の存在⁷²⁾等が考えられる。しかしヒトの担癌状態と NK 活性抑制との関連はまだ明らかではない。

一方 Ca 9-22 に対する障害性は健康人群と口腔癌患者群とは分けて考える必要があると思われる。Sondel ら⁷³⁾は、*in vitro* で感作した後に抗原特異的なレセプターをもつ T 細胞が特異的に標的細胞を破壊する現象を報告しているが、*in vitro* の感作によって、口腔癌患者のリンパ球に、口腔癌由来培養細胞である Ca 9-22 の癌特異抗原に対する CTL をもつ可能性は否定できない。藤林²¹⁻²⁴⁾は口腔癌患者において、Ca 9-22 に対する MCA で健康人群に対して初期癌群の CMC が高く、進行癌群で低いことを示し、初期癌群の T 分画に高い CMC があることより CTL の可能性を示唆し、和気²⁵⁾はこの T 分画中の T FcR⁺ 分画が有意に高いことを示している。確かに Ca 9-22 の 18 時間 assay では、K 562 の 6 時間 assay と違って進行癌群の平均値が若干健康人群より高い障害性を示したが、それはいずれも低い値で、しかも狭い範囲での変動であった。Ca 9-22 に対する健康人リンパ球の障害性は NK 細胞によると考えられるが、口腔癌患者においても健康人群とほとんど変わらない

い障害性を示し、CTL の関与は否定的であった。CTL が作用するためには、組織適合抗原系の一致が必要であることなどを考え合わせると、本研究における Ca 9-22 に対する障害性は大半が NK 細胞によるものではないかと考えられる。

転移をもつ癌の領域リンパ節の NK 活性や癌細胞に対して直接接触している TIL の NK 活性は *in vivo* での NK 細胞の役割を考える意味で興味のあるところである。本研究の結果では PBL に比較して LN, TIL とともにその NK 活性は非常に低い値を示した。ヒトのリンパ節の NK 活性について報告は少ないが、マウスでは活性は低い障害性を有しており⁷⁴⁾、また同系の扁平上皮癌を移植すると2週目に NK 活性は高くなりその後次第に減少することが報告されている。ヒトでは Eremin ら⁶⁷⁾は、健康人リンパ節ならびに癌患者リンパ節でもある程度の NK 活性を有しているが、PBL と比べてトリプシンや NH₄Cl 処理に対する感受性の違いから NK 活性を示す細胞が異なることを示し、Vose ら¹⁸⁾は癌患者のリンパ節にはほとんど NK 活性がみられないとし、また北屋ら⁷⁵⁾も頭頸部癌における頸部リンパ節の NK 活性は非常に低く、その% cytotoxicity は10%以下であったとしているが、本研究の結果も同様であった。また TIL に関しては、直腸癌では PBL で障害性がみられないときでも TIL に障害性が示されるときがある⁷⁶⁾という報告があるが、Vose¹⁸⁾、Eremin ら⁶⁷⁾はそれぞれ肺癌、乳癌で TIL の NK 活性はみられないとし本研究の結果でも口腔癌の TIL にはほとんど NK 活性はみられなかった。その理由として、あらかじめインターフェロンで処理しても TIL の NK 活性の上昇がみられない⁷⁷⁾ことから、TIL 中には NK 細胞あるいは NK 前駆細胞が少ないことが考えられる。また、LN, TIL の細胞が PBL の NK 活性を抑制することから、LN, TIL 中に腫瘍の存在による NK 活性に対する抑制機構が働いているのではないかと考えられるが、リンパ球の幼若化反応は抑制するが NK 活性は抑制しないとの報告¹⁸⁾もあり、抑制機構に関しては不明な点が多い。いずれにしても LN, TIL の NK 活性が低下していることについては大体意見の一致をみているところである。

担癌患者の手術前後の NK 活性については、すべての患者で手術後2週目に NK 活性の一時的な低下がみられた。外科的手術による生体への侵襲に対して免疫系も大きな影響を受けることが予想される。このことは CMC, ADCC, リンパ球幼若化反応、白血球遊走阻止反応などが、術後一時的に低下する^{78,79)}ことなどから、一般的非特異的免疫反応の低下によって NK 活性も低下すると考えられる。反応の低下が起きる原因としてステロイドホルモンが手術中に放出され、そのために免疫抑制作用が促されるという説⁷⁹⁾もある。事実ステロイド

ホルモンの投与者の NK 活性は有意に低下している⁵⁴⁾手術操作により少数の癌細胞が遊離、散布される可能性があるときに、抗腫瘍細胞免疫反応が抑制されているということは、潜在的転移の原因となる可能性が十分に考えられる。

ところで NK 細胞が *in vivo* での腫瘍の発生、増殖に対して防御機構として働いているならば、術後の再発、転移に対しても何らかの役割を果たすものと思われる。本研究の結果でも、初期癌群では現在まで全例予後良好であるが、いずれも術後2週目からの NK 活性の上昇、回復がみられ、また進行癌群においても Ao 群では回復がみられた。一方 Ac 群では明らかな回復がみられず、さらに NK 活性の値も非常に低いものであった。転移癌患者の NK 活性は健康人群に比べて非常に低い¹⁷⁾といわれているが、本研究の結果からも NK 細胞の再発、転移に対する防御機構としての役割を示唆するものであった。また最近、化学療法と NK 活性について、たとえば溶連菌製剤の一つである OK-432 についてマウスでその投与によりマクロファージの活性化と NK 活性の上昇がみられたこと⁶⁰⁾や、ヒトでも免疫能の上昇を裏付ける報告⁸¹⁾がある。また化学療法中は NK 活性は低下していたが、治療後有効例は NK 活性の回復がみられ、無効例では NK 活性の回復が遅い⁸²⁾ということ等から、NK 活性は癌治療において、その有効性を示唆する一つの指標となりうる可能性があると思われる。

NK 細胞の *in vivo* での役割についてははっきりとしたことはまだよくわかっていないが、最近 NK 細胞だけに特異的に反応する抗体がみつかりその研究が進められている。マウスでは asialo GM 1 に対する抗体が NK 細胞と特異的に反応し、リンパ球をこの抗体で処理すると NK 活性が消失することが示され、抗 asialo GM 1 投与群では移植腫瘍だけでなく発癌物質による自家発生腫瘍においても腫瘍発生率が高いことが示された⁸³⁾。またヒトの NK 細胞に関しても、細胞融合法により特異的な単一抗原基と反応し、単一の抗体クラスであるモノクローナル抗体が産生されるようになり、NK 細胞の分化抗原と反応すると考えられる H-NK 1 が発見され⁸⁴⁾今後の研究発展に大いに役立つものと思われる。

結 論

口腔癌患者の細胞性免疫能を検討する目的で ⁵¹Cr 遊離試験法を用いて NK 活性を測定した。対象は口腔癌患者27名、健康人19名で、標的細胞は慢性骨髄性白血病由来培養細胞 K 562 と歯肉扁平上皮癌由来培養細胞 Ca 9-22 を用いた。

I. NK 活性測定の実験条件

K 562, Ca 9-22 とともに、1 well 内にまく細胞数を

1×10^4 個にした場合、変動の少ない測定値が得られた。K 562 と Ca 9-22 ではその障害性に明らかな違いがみられた。K 562 は T: E ratio に従い dose-response curve を描き、1:50 で十分な障害性を示した。またその反応は6時間でプラトーに達した。Ca 9-22 は T: E ratio に関わらずほぼ一定の低い障害性を示した。またその反応は18時間まで徐々に高くなった。よって標的細胞数 1×10^4 個、T: E ratio は 1: 50、assay 時間は K 562 が6時間、Ca 9-22 は18時間が適当と思われた。

II. effector 細胞の検討

Unf 分画と Mφ-dep 分画を比較すると、Unf 分画が若干高い NK 活性を示したが有意差はなかった。T 分画と non-T 分画では K 562 の6時間 assay、Ca 9-22 の18時間 assay で non-T 分画に危険率5%で有意に高い活性がみられた。

III. 担癌患者の NK 活性

1) 担癌状態による比較

K 562 の6時間 assay において初期癌群は健康人群に比べて若干高い NK 活性を示したが有意差はみられなかった。進行癌群は健康人群と比較して有意に低い活性を示した。また癌患者群の間でも、初期癌群に比較して進行癌群は有意に低い活性を示した。また Ca 9-22 の18時間 assay では3群の間に有意差はみられなかった。

2) PBL, TIL, LN の NK 活性の比較

TIL, LN の NK 活性は PBL に比べて有意に低い活性を示した。TIL と LN は有意差はなくとも非常に低い値であった。

3) 同一患者における治療前後の時間的経過による NK 活性の変動

すべての患者において術後2週目に著明な NK 活性の低下がみられた。その後1か月後から NK 活性の上昇がみられたが、Ao 群では術前の NK 活性までの回復が良好の患者が多かったのに対し、Ac 群では明らかな回復がみられず、臨床状態と相関する傾向がうかがわれた。また Ac 群の NK 活性は非常に低いものであった。

稿を終えるにあたり、ご懇篤なるご指導とご校閲を賜った榎本昭二教授、ならびにご校閲を賜った伊藤秀夫本学名誉教授、本学第1口腔外科学教室塩田重利教授、本学第2歯科理工学教室佐藤温重教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究に際し、直接ご懇切なるご指導、ご教示を頂いた本教室藤林孝司博士ならびに高橋雄三博士に心から感謝の意を表し、またご援助頂いた第2口腔外科学教室員各位に心からの謝意を表します。

本論文の要旨の一部は、昭和57年5月の第36回日本口腔科学会総会、昭和57年9月の第20回癌治療学会総会において発表した。

なお、本研究は文部省科学研究費による助成によって行われたことを付記し、謝意を表する。

引用文献

- 1) Kiessling, R., Klein, E. and Wigzell, H.: "Natural" Killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. Specificity and distruction according to genotype. *Eur J Immunol* 5: 112 1975.
- 2) Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., et al.: "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 5: 117 1975.
- 3) Herberman, R.B., Nunn, M.E. and Lavrin, H.D.: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogenic tumors. I Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* 16: 216 1975.
- 4) Herberman, R.B., Nunn, M.E., Holden, H.T., et al.: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Charcterization of effector cells. *Int J Cancer* 16: 230 1975.
- 5) West, W.H., Cannon, G.B., Kay, H.D., et al.: Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line; Characterization of effector cells. *J Immunol* 118: 355 1977.
- 6) West, W.H., Payne, S.M., Weese, J.L., et al.: Human T lymphocyte subpopulations. Correlation between E-rosette-forming affinity and expression of the Fc receptor. *J Immunol* 119: 548 1977.
- 7) Bolhuis, R.L.H., Schuit, H.R.E., Nooyen, A.M., et al.: Characterization of natural killer (NK) cell and killer (K) cells in human blood. discrimination between NK and K cell activities. *Eur J Immunol* 8: 731 1978.
- 8) De Vries, J.E., Cornain, S. and Rümke, P.: Cytotoxicity of non-T versus T-lymphocytes from melanoma patients and healthy donors on short-and long-term cultured melanoma cells. *Int J Cancer* 14: 427 1974.
- 9) Jondal, M. and Pross, H.: Surface markers on human B and T lymphocytes. VI. Cytotoxicity against cell lines as a functional marker for lymphocytes subpopulations. *Int J Cancer* 15: 596 1975.
- 10) Bakács, T., Gergely, P., Cornain, S., et al.: Characterization of human lymphocytes subpopulations for cytotoxicity against tumor-

- derived monolayer cultures. *Int J Cancer* 19: 441 1977.
- 11) Kiuchi, M., Takasugi, M.: The nonselective cytotoxic cell (Ncell). *J Natl Cancer Inst* 56: 575 1976.
- 12) Eremin, O., Coombs, R.R.A., Plumb, D., et al.: Characterization of the human natural killer (NK) cell in blood and lymphoid organs. *Int J Cancer* 21: 42 1978.
- 13) Santoli, D., Trinchieri, G., Moretta, L., et al.: Spontaneous cell-mediated cytotoxicity in humans. Distribution and characterization of the effector cell. *Clin Exp Immunol* 33: 309 1978.
- 14) Takasugi, M., Koide, Y., Akira, D., et al.: Specificities in natural cell-mediated cytotoxicity by the cross-competition assay. *Int J Cancer* 19: 291 1979.
- 15) Takasugi, M., Takasugi, J., Akira, D., et al.: Specificities in human cell-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 59: 69 1977.
- 16) Cannon, G.B., Bonnard, G.D., Djeu, J., et al.: Relationship of human natural lymphocyte-mediated cytotoxicity to cytotoxicity of breast-cancer-derived target cells. *Int J Cancer* 19: 487 1977.
- 17) Pross, H.F., and Baines, M.G.: Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. I. The effect of malignant disease. *Int J Cancer* 18: 593 1976.
- 18) Vose, B.M., Vankey, F. and Klein, E.: Human tumor-lymphocyte interaction *in vitro* V. Comparison of the reactivity of tumor-infiltrating, blood and lympho-node lymphocytes with autologous tumor cells. *Int J Cancer* 20: 895 1977.
- 19) 松井武志, 滝 正憲, 折田薫三, 他: 健常および各種消化器癌患者末梢血リンパ球の各分画における, NK 活性, ADCC 活性の検討. *日癌治* 16(6): 1275 1981.
- 20) Perlman, P., Troye, M. and Pape, G.: Cell mediated immune reaction to human tumors. *Cancer* 40: 448 1977.
- 21) 藤林孝司, 佐藤 修, 藤村長久, 他: 口腔癌患者の細胞性免疫反応に関する研究 第3報 Microcytotoxicity assay. *臨床免疫* 9(12): 111 1977.
- 22) Fujibayashi, T., Sato, O. and Itoh, H.: Stage-related cell-mediated cytotoxicity with effector cell analysis and computation of cytotoxic activity of T cells and non-T cells. *Cell Immunol* 44: 225 1979.
- 23) 藤林孝司, 佐藤 修, 高橋雄三, 他: Cell-mediated cytotoxicity における T cell 活性および non-T cell 活性の測定. *アレルギー* 28(7): 569 1979.
- 24) 佐藤 修: 口腔癌患者リンパ球の cytotoxicity における effector cell の研究. *日口外誌* 24(6): 1029 1978.
- 25) 和氣不二夫: 口腔癌患者リンパ球の CMC における effector cell の研究——特に IgG Fc receptor 陽性細胞について—— *日口外誌* 26(6): 1464 1980.
- 26) Brunner, K.T., Mauel, J., Cerottini, J.C., et al.: Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ^{51}Cr -labelled allogeneic target cells *in vitro*. Inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunol* 14: 181 1968.
- 27) 菊地浩一: ^{51}Cr 標識細胞試験. 免疫実験操作法 A, 日本免疫学会編, 1975, 349頁.
- 28) 松本美富士, 高野浩一, 若園消行: ヒトの Natural killer (NK) 活性の測定. 免疫実験操作法, IX 日本免疫学会編, 1980, 2783頁.
- 29) UICC International Union Against Cancer: "TNM classification of Malignant Tumors" 3rd Ed. UICC, Geneva: 23.
- 30) Luzzio, C.B., and Luzzio, B.B.: Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive philadelphia chromosome. *Blood* 45: 321 1975.
- 31) Anderson, L.C., Jokinen, M. and Gahrberg, C.G.: Induction of erythroid differentiation in the human leukemia cell line K 562. *Nature* 278: 364 1975.
- 32) 堀越 勝, 木村義孝, 名倉英明, 他: 人の菌肉癌由来の細胞株の樹立 (第1報). *日口外誌* 20: 100 1974.
- 33) Lohrman, H.P., Novikovs, L. and Grew, R.G.: Stimulatory capacity of human T and B lymphocytes in the mixed leukocyte culture. *Nature* 250: 144 1974.
- 34) Yata, J., Tsukimoto, I. and Tachibana, T.: Human lymphocyte subpopulations. Human thymus-lymphoid tissue (HTL) antigen-positive lymphocytes and HTL antigen-negative lymphocytes interacting with antigen-antibody-complement complexes. *Clin Exp Immunol* 14: 319 1973.
- 35) Weiner, M.S., Bianco, C. and Nussenzweig, V.: Enhanced binding of neuraminidase-treated sheep erythrocytes to human T lymphocytes. *Blood* 42: 939 1973.
- 36) 吉永 秀: 赤血球除去用トリス緩衝液. 免疫実験操作法 A, 日本免疫学会編, 1973, 450頁.
- 37) Svennevig, J.L., Lövik, M. and Svaar, H.: Isolation and characterization of lymphocytes and macrophages from solid, malignant human tumors. *Int J Cancer* 23: 626 1979.
- 38) 矢田純一, 藤原道夫編著: リンパ球機能検索法. 第1版, 中外医学社, 東京, 1980, 23頁.

- 39) Cerottini, J.C. and Brunner, K.T.: Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection and tumor immunity. *Adv Immunol* 18: 67 1974.
- 40) Möller, E.: Contact-induced cytotoxicity by lymphoid cells containing foreign isoantigens. *Science* 147: 873 1965.
- 41) Nunn, M., Djen, J., Lavrin, D., et al.: Natural cytotoxic reactivity of rat lymphocytes against syngeneic gross leukemia. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 14: 87 1973.
- 42) Nathan, C.F., Karnovsky, M.L. and David, J.R.: Alternations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J Exp Med* 133: 1356 1971.
- 43) Koide, Y., Kwok, R. and Takasugi, M.: Studies of effector cell, antibody and target cell interaction in natural cell-mediated cytotoxicity. *Int J Cancer* 22: 546 1978.
- 44) Herberman, R.B.: Natural cell-mediated immunity against tumors. Academic Press. New York: 465 1980.
- 45) Roder, J.C., Haliotis, T., Klein, M., et al.: A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells. *Nature* 284: 553 1980.
- 46) Takasugi, M. and Klein, E.: A microassay for cell-mediated immunity. *Transplantation* 9: 219 1970.
- 47) 橋本嘉幸, 北川恒代: ^3H -ウリジン法による試験管内細胞性反応の定量化. 免疫実験操作法 A, 日本免疫学会編, 1975, 1799頁.
- 48) 小寺良尚, 珠久 洋, Bean, M.A.: ^3H プロリンによる Microcytotoxicity 試験. 免疫実験操作法 VII, 日本免疫学会編, 1977, 1799頁.
- 49) 藤 堅太郎, 菊地浩吉: ^3H -thymidine の post labelling による細胞障害試験. 免疫実験操作法 VI, 日本免疫学会編, 1977, 1809頁.
- 50) 五十嵐 敢: ^{125}I -UdR release assay による cell mediated cytotoxicity の微量測定. 免疫実験操作法 VIII, 日本免疫学会編, 1979, 2431頁.
- 51) Zoltan, J.L., 矢野啓介: ^{86}Rb を用いた細胞傷害試験. 免疫実験操作法 VI, 日本免疫学会編, 1977, 1791頁.
- 52) 日沼州司, 多田正人, 熊谷勝男: ^{51}Cr 標識細胞を用いた抗体依存性細胞仲介性細胞障害 (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity, ADCC) の測定. 免疫実験操作法, 1979, 2433頁.
- 53) Pross, H.F. and Baines, M.G.: Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. I The effect of malignant disease. *Int J Cancer* 18:593 1976.
- 54) 押味和夫, 榎田信之, 狩野庄吾: ヒト Natural Killer 細胞活性測定上の問題点. 臨床免疫 11 (1): 73 1979.
- 55) 押味和夫, 狩野庄吾: Natural killer 活性測定法. 日臨免誌 3(4): 225 1980.
- 56) Ortaldo, J.R., Kay, H.D. and Bonnard, G.D.: *In vitro* induction of natural killer (NK) and killer (K) cell In "Proceedings of the 11th leukocyte confence". Academic Press. New York: 542 1977.
- 57) Herberman, R.B.: Natural cell-mediated immunity against tumors. Academic Press. New York: 1063 1980.
- 58) Herberman, R.B.: Natural cell-mediated immunity against tumors. Academic Press. New York: 973 1980.
- 59) Roder, J.C., Ahrlund, R.L. and Jondal, M.: Target-effector interaction in the human and murine natural killer system. *J Exp Med* 150: 471 1979.
- 60) Gidlund, M., Örn, A., Pattengale, P.K., et al.: Natural killer cells kill tumor cells at a given stage of differentiation. *Nature* 292: 848 1981.
- 61) Collins, J.L., Patek, P.Q. and Cohn, M.: Tumorigenicity and lysis by natural killers. *J Exp Med* 153: 89 1981.
- 62) Herberman, R.B.: Natural cell-mediated immunity against tumors. Academic Press. New York: 449 1980.
- 63) Herberman, R.B.: Natural cell-mediated immunity against tumors. Academic Press. New York: 465 1980.
- 64) Herberman, R.B.: Natural cell-mediated immunity against tumors. Academic Press. New York: 1219 1980.
- 65) Trinchieri, G. and Santoli, D.: Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus transformed cells. *J Exp Med* 147: 1314 1978.
- 66) Djeu, J.Y., Heinbaugh, J.A. and Holden, M.T.: Role of macrophage in the augmentation of mouse natural killer cell activity by poly I:C and interferon. *J Immunol* 122: 182 1979.
- 67) Eremin, O., Ashby, J. and Stephens, J.P.: Human natural cytotoxicity in the blood and lymphoid organs of healthy donors and patients with malignant disease. *Int J Cancer* 21: 35 1978.
- 68) 藤林孝司, 佐藤 修, 宇津宮幸正, 他: 口腔癌患者の細胞性免疫反応に関する研究 第2報 PHA によるリンパ球幼若化反応. 日口外誌 23: 35 1977.
- 69) 藤林孝司, 宮沢晋次, 高橋雄三, 他: 口腔癌患者の細胞性免疫反応に関する研究 第1報 DNCB 反応, および PPD 反応について. 日口外誌 22: 624 1976.
- 70) 宇津宮幸正: 口腔癌患者のリンパ球混合培養反

- 応 (MLCR). 日口外誌 25: 1253 1979.
- 71) Herberman, R.B.: Natural cell-mediated immunity against tumors. Academic Press. New York: 779 1980.
- 72) Herberman, R.B.: Natural cell-mediated immunity against tumors. Academic Press. New York: 735 1980.
- 73) Sondel, P.M., Chess, L., MacDermott, R.P., et al.: Immunologic functions of isolated lymphocyte subpopulations. III Specific allogeneic lympholysis mediated by human T cell alone. J Immunol 114: 982 1975.
- 74) Shellam, G.R., Hogg, N.: Gross-virus-induced lymphoma in the rat. IV Cytotoxic cells in normal rats. Int J Cancer 19: 212 1977.
- 75) 北屋友幸, 東家倫夫, 猪川 勉, 他: 所属リンパ節の腫瘍免疫学的検索. 頭頸部腫瘍学会 8: 234 1981.
- 76) Werkmeister, J.A., Phil, E., Nind, A.P., et al.: Immuno-reactivity by intrinsic lymphoid cells in colorectal carcinoma. Br J Cancer 40: 839 1979.
- 77) Moore, M. and Vose, B.M.: Extravascular natural cytotoxicity in man. Anti-K 562 activity of lympho-node and tumor-infiltrating lymphocytes. Int J Cancer 27: 265 1981.
- 78) Vose, B.M. and Moudgil.: Post-operative depression of antibody-dependent lymphocyte cytotoxicity following minor surgery and anaesthesia. Immunol 30: 123 1976.
- 79) A.J. コ克蘭 (西岡久寿彌, 向島達監訳) ヒト・がん・免疫. 講談社, 東京, 1980, 138頁.
- 80) 和田洋己, 松延政一: 癌と免疫療法——溶連菌製剤 OK-432 の検討——. III 腹腔内非特異キラー細胞の性格——キラーマクロファージとNK細胞. 癌と化学療法 8: 1794 1981.
- 81) 若杉 尋, 宮田道夫, 森田友彦: 癌患者における溶連菌製剤 OK-432 の natural killer 細胞活性再増強作用. 日臨免誌 4(3): 111 1981.
- 82) 西條長宏, 木村公一, 入交信広: 人末梢血リンパ球細胞障害能 (ADDC, NK 活性) の抗癌免疫能としての意義. 癌と化学療法 8 (増刊): 2 1981.
- 83) Habu, S., Fufui, H., Shimamura, K., et al.: *In vivo* effects of anti-asialo GM1. I Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. J Immunol 127: 34 1981.
- 84) Abo, T., and Balch, C.M.: A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). J Immunol 127: 1024 1981.