自己免疫疾患における natural cell mediated cytotoxicity (NCMC)

2. Sjögren 症候群, RA 患者リンパ球の NCMC 活性

後 藤 眞・荏 原 忠 夫・谷 本 潔 昭・堀 内 淑 彦

Natural cell mediated cytotoxicity (NCMC) in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis

Makoto Goto, Tadao Chihara, Kiyoaki Tanimoto, Yoshihiko Horiuchi

*Department of Internal Medicine and Physical Therapy,
Faculty of Medicine, University of Tokyo, Japan.*

【Summary】

The natural cell mediated cytotoxicities (NCMC) were measured in 4 patients with Sjögren's syndrome (SjS) without complication of connective tissue disease (CTD), 4 patients with SjS associated with CTD other than rheumatoid arthritis (RA), 11 patients with SjS associated with RA, and 29 patients with RA without SjS. All 19 patients with SjS showed significantly suppressed NCMC. In the patients with RA without SjS, NCMC of 21 female cases were rather enhanced when compared with controls, while 8 male patients did not differ from controls. The reduced NCMC in SjS did not seem to correlate with the presence of antilymphocyte antibody (ALA). It is of interest that more accelerated NCMC were demonstrated in the patients with RA receiving gold therapy.

Key words : natural cell mediated cytotoxicity (NCMC)
natural killer (NK)
Sjögren's syndrome
rheumatoid arthritis
gold therapy

【概 要】

前報で報告した全身性エリテマトーデス (SLE) 患者の natural killer (NK) 活性の低下と比較しつつ, Sjögren 症候群 (SjS)・慢性関節リウマチ (RA) 患者の NK 活性を調べた. 19 例の女性の SjS の NK 活性は対照に比較して有意に低下していた. 逆に, 29 例の RA のうち, 21 例の女性の患者では, 対照に比べ有意に上昇していた. SjS の NK 活性の低下の原因としては, NK 活性自体の欠陥とともに, 抗リンパ球抗体や使用薬剤・免疫複合体等の関与が考えられるが, 今回の結果では, 抗リンパ球抗体の関与は少ないと考えられた. NK 活性の高い RA 患者では金療法を受けている例が多く, 金製剤の投与量と NK 活性との間に, 有意な相関が認められた.

I. はじめに

前報で, SLE 患者の NK 活性の低下ならびに抗リンパ球抗体・免疫複合体・プレドニソロン等のNK 活性抑制作用について報告した¹⁻³⁾. Sjögren 症候群 (SjS) が, SLE と同様に免疫学的異常を基礎にした疾患で, 悪性リンパ腫等の悪性腫瘍の発生が多いことはよく知られた事実であり, 比較的悪性腫瘍の発生の少ない慢性関節リウマチ (RA) 患者における NK 活性との比較は, NK 活性と腫瘍発生との関係につき, 興味ある知見を与えてくれるものと考えられる. また, この両疾患の臨床病態と NK 活性との関係の解析は NK 細胞の免疫監視機構での役割を知るうえでも多くの情報をもたらすものと思われる, 今回の検索を行なった.

II. 材料ならびに方法

1) 対象

対象として用いたサンプルは, 東京大学物療内科受診中のシェーグレン症候群 (SjS)・慢性関節リウマチ (RA) の患者から得られた. SjS 患者は厚生省診断基準により⁴⁾, 臨床的に口内乾燥感・乾燥性角結膜炎・反復性耳下腺腫脹などを伴い, Schirmer 試験あるいは sialography (耳下腺造影) で陽性所見を示したもののみを対象とした. RA 患者は, アメリカリウマチ協会作成の診断基準で⁵⁾ definite 以上の RA と診断された者を対象とした. 19 例の SjS 患者は, いずれも女性で, 年齢 19~64 歳であり, RA 患者は 29 例で (女性 21 例, 男性 8 例) で年齢は 26~69 歳であった. SjS のうち 4 例は, 全身性エリテマトーデス (SLE)・全身性硬化症 (PSS)・原発性胆汁性肝硬変症 (PBC) などの自己免疫疾患を合併し, また, RA と SjS の合併例は 11 例あった (表 1).

コントロールとしては, 年齢・性をマッチさせた 34 人の健康人を選んだ.

RA・SjS の大部分の例は, 比較的良好にコントロールされ, 11 例でステロイドは, プレドニソロン換算 5~25 mg/日の投与を受けていた. RA 患者の約半数は, 金製剤 (シオゾール, aurothiomalate) を毎日 10~50 mg を投与されており, その他は, 非ステロイド系抗炎症剤, すなわち, 3 g/日以下のアスピリン, 150 mg/日以下のインドメサシンなどの投与を受けていた. 臨床検査成績では, 表 1, 表 2 に示すように, 抗核抗体は陰性から, speckled pattern で 64 倍まで, 血沈は平均 41 mm/h, CRP は (-) から 6+までで, RA テストは (-) から 1+までであり, Waaler-Rose テストでは, 1: <8 から 1: 512

まで, 補体価 (CH₅₀) は平均 35.8 U/ml であり, 活動性のバラツキがみられたが, 免疫複合体 (immune complex) は, 相川らの開発したヒト赤血球補体レセプター法⁶⁾により測定したが正常範囲 10 µg/ml 以下) であった.

2) 作用細胞

ヘパリン採血した患者末梢血を Ficoll-Conray (比重 1.078) 比重遠心法により, 単核球分画をとりだし, ペトリ皿に 37°C 1 時間 incubate して付着細胞を除き, 非付着性のリンパ球分画を作用細胞として用いた.

3) 標的細胞

標的細胞には, ヒト慢性骨髄性白血病由来の細胞株 K 562 を用いた. この細胞株は, Tennessee 大学の Dr. Lozzio より供与されたものである.

4) 標識 ⁵¹Cr 遊離測定法

測定法は既法と同一の方法で行なった. 作用細胞 (effector) と標的細胞 (target) の比 [E/T ratio] は 40:1 で行ない, %細胞傷害活性 (NK 活性) は次式より求めた.

%細胞傷害活性 =

$$\frac{\text{サンプル } ^{51}\text{Cr 遊離量} - \text{無処置 } ^{51}\text{Cr 遊離量}}{\text{最大 } ^{51}\text{Cr 遊離量} - \text{無処置 } ^{51}\text{Cr 遊離量}} \times 100$$

5) NK 細胞活性に影響を及ぼす因子の検索

NK 活性は, 種々の因子により影響されることが知られているが, 本論文では, 抗リンパ抗体とインターフェロンの NK 活性に及ぼす影響を観察した.

a) 抗リンパ球抗体の NK 活性に及ぼす影響

抗リンパ抗体の力価の比較的高い SjS と RA の患者血清を選び, 56°C 30 分加熱非働化して用いた. コントロールとしては抗 NK 活性の認められる SLE 患者の血清と正常人血清を同様に非働化して用いた. 健康人リンパ球 2.0~10.0×10⁶/0.1 ml を 0.1 ml の被検血清と 15°C 30 分反応させ, 続いて, 3 倍量のウサギ補体を加え, 15°C 150 分反応させ, トリパンブルー染色法で, 細胞傷害率を調べたのち, NK 活性を測定した. 抗リンパ抗体の NK 活性の抑制率は以下の式を用いて算出した.

%抑制率 =

$$\frac{\text{補体非作用時 } ^{51}\text{Cr 遊離量} - \text{補体作用時 } ^{51}\text{Cr 遊離量}}{\text{補体非作用時 } ^{51}\text{Cr 遊離量} - \text{無処置 } ^{51}\text{Cr 遊離量}} \times 100$$

b) インターフェロンの NK 活性への影響

ヒト白血球由来のインターフェロン (IFN-α) は Helsinki の Dr Kari Cantell より供与を受けた. 用いた IFN-α の活性は 7.2×10⁵ units/mg protein であった. IFN-α の希釈列を RA・SLE・SjS・正常人各 2 例ずつ

表 1 Sjögren 症候群 (SjS) 患者の検査所見

Disease	Patients ¹⁾	Age	ESR ²⁾	CRP ³⁾	LFT ⁴⁾	SSCA ⁵⁾	CH50 ⁶⁾	ANA ⁷⁾	Prednisolone (mg daily)
SjS	E.S.	19	29	—	+	1:256	29.5	Sp 1:10	25
	K.K.	19	50	+	+	1:512	49.2	—	0
	I.N.	55	13	±	+	1:32	41.0	—	5
	T.M.	64	39	—	+	1:32	42.1	—	0
SjS+CTD	K.F.	31	82	—	+	1:64	28.6	Sp 1:60	0
	R.T.	42	44	+	+	1:64	26.6	P 1:40	0
	K.F.	44	99	±	+	1:64	48.9	Sp 1:640 Sp 1:10	0
	S.M.	55	30	—	—	1:8	32.1	—	0
SjS+RA	K.O.	36	20	+	+	1:128	32.3	—	0
	K.K.	43	25	+	+	1:512	nd	—	0
	K.K.	49	15	—	+	1:256	26.2	—	0
	S.B.	54	78	+	+	1:64	33.7	—	0
	S.T.	55	61	—	+	1:128	nd	—	10
	J.K.	55	23	±	+	1:128	40.8	—	10
	T.M.	60	32	—	+	1:16	32.0	Sp 1:5	0
	A.K.	65	45	—	+	1:256	29.5	Sp 1:5	0
	F.M.	68	13	—	—	1:8	nd	—	0
	F.A. ⁸⁾	69	21	—	—	1:8	nd	—	0
	A.S.	71	80	±	+	1:64	nd	—	0

1) All the patients were females.

2) Erythrocyte sedimentation rate(ESR) was examined by Westergren method.

3) C reactive protein(CRP).

4) Latex-fixation test(LFT).

5) Sensitised sheep cell agglutination(SSCA) (Normal range was less than 1:8).

6) Serum CH50 was measured by Mayer's method(8) (Normal range: 29.3—43.9 U/ml).

7) Anti-nuclear antibodies(ANA) were detected by immunofluorescence method(7) and staining patterns were expressed as speckled(Sp) and peripheral(P). The final dilution of the serum giving positive staining was determined as a titer of ANA.

8) Only patient F.A. was treated with gold(10mg monthly).

の等量の作用細胞 ($0.5 \times 10^7/0.5 \text{ ml}$) と 37°C 4 時間 incubate したのち洗浄し, NK 活性を上記述べた方法で測定した。

III. 結果

Sjögren 症候群 (SjS)・慢性関節リウマチ (RA) ならびに正常人の末梢血リンパ球の NK 活性を表 3 に示す。NK 活性に性差があるため男女別に示し, コントロールもおおのの年齢をマッチさせて男女別に示して比較した。SjS の NK 活性は他の RA を含めた膠原病 (CTD) の合併の有無にかかわらず, コントロールに比べて有意な低下を認めた。一方, RA 患者とくに女性の患者では, NK 活性が有意に上昇していた。

NK 活性は種々の因子に影響されることが知られているため, 治療薬と NK 活性との関係を調べてみた。対象

とした SjS と RA の患者をステロイド療法を行なっているものといないもの, 金療法を行なっているものといないものに分け, それぞれのグループで NK 活性を比較してみた(表 4)。その結果, それぞれのグループの症例数が少なく解釈のむずかしい点もあるが, 金療法もステロイド療法も行っていない RA の患者は, SjS を合併した RA, SjS alone, SjS に他の膠原病を合併しているグループに比べて NK 活性が上昇している傾向がみられた。さらに, ステロイドを使用せずに金療法のみを受けてる患者では, 他の RA の患者に比べて, NK 活性が有意に上昇していた。

治療に用いられた金製剤の月間の投与量と NK 活性との関係をみると, 両者の間には, $r=0.6648$ ($p<0.01$) で, 有意な正の相関関係が得られた (図 1)。

次に抗リンパ球抗体の影響を調べるため正常人リンパ

表 2 慢性関節リウマチ (RA) 患者の検査所見

Patients	Age	Sex	ESR ¹⁾	CRP ²⁾	LFT ³⁾	SSCA ⁴⁾	CH50 ⁵⁾	Prednisolone (mg daily)	gold (mg monthly)
H.N.	26	F	34	—	+	1:64	24.2	10	0
S.T.	26	F	25	+	—	1:8	29.7	0	40
Y.S.	27	F	63	+	+	1:16	30.0	0	50
A.H.	30	F	8	—	±	1:64	26.6	0	50
H.S.	30	F	68	++++	—	1:16	nd	0	20
Y.K.	31	F	7	—	+	1:16	37.1	0	0
Y.T.	34	F	24	+	—	1:8	nd	0	0
N.I.	34	F	18	—	±	1:8	nd	0	40
M.M.	37	F	27	+	+	1:8	42.1	0	0
K.H.	38	M	13	+	±	1:8	30.7	0	25
F.W.	40	F	60	+	—	1:8	43.5	0	50
H.M.	41	F	38	+	±	1:16	32.7	20	0
K.S.	45	M	55	++++	+	1:256	nd	0	25
K.T.	45	F	39	+	+	1:128	31.8	7.5	0
M.Y.	46	F	81	++++	+	1:256	44.4	10	0
J.I.	47	F	70	±	—	1:8	24.1	0	40
S.I.	49	F	65	+	+	1:8	48.3	0	0
T.R.	50	M	25	+	+	1:16	37.3	0	0
S.S.	52	M	52	—	+	1:64	31.9	0	0
M.K.	55	F	52	+	+	1:256	nd	0	20
K.T.	56	M	39	+	—	1:8	40.5	0	0
J.I.	57	M	70	+	+	1:128	51.9	0	50
M.K.	58	F	28	—	+	1:32	39.6	0	20
K.H.	59	M	13	+	+	1:512	nd	10	0
H.T.	60	F	11	+	+	1:512	40.8	0	30
T.M.	60	F	40	+	—	1:8	39.9	5	0
A.Y.	65	F	77	+	+	1:64	nd	0	50
T.K.	67	M	25	+	+	1:128	45.4	0	50
K.M.	69	F	19	—	+	1:8	24.6	10	0

- 1) Erythrocyts sedimentation rate(ESR) was examined by Westergren method.
- 2) C reactive protein(CRP).
- 3) Latex-fixation test(LFT).
- 4) Sensitised sheep cell agglutination(SSCA) (Normal range was less than 1:8).
- 5) Serum CH50 was measured by Mayer's method(8) (Normal range: 29.3—43.9U/ml).

球を抗リンパ球抗体活性を示す SjS 2 例, RA 2 例を選んで, ウサギ補体で処理し, 残存する NK 活性を SLE 血清で同時に処理した場合と比較した. 結果は表 5 に示すように, SjS・RA の血清は 25% 以下の抑制しか示さず, コントロールと比べて有意差がみられなかった. これに反して, SLE 血清はいずれも 40% 以上の抑制率を示し, 抗リンパ球抗体の正常人リンパ球に対する細胞傷害活性が, SjS あるいは RA の血清と稀釈した SLE 血清が有意差がほとんどみられなかったのに比し, SjS あるいは RA 血清は NK 活性を抑制する能力は低かった.

さらに, 他の血清因子すなわち immune complex に

についても検討を加えたが, 対象とした SjS・RA の血清はすべて 10 $\mu\text{g/ml}$ 以下であり, 正常範囲であった.

最後に, NK 活性を増強する作用のあることの知られているインターフェロンで, RA・SjS・SLE リンパ球を処理して, その効果を観察した. 図 2 に示すように, RA・SjS・SLE の 3 者ともに正常人に比べて, インターフェロンによる増強効果は少ない傾向が認められた.

IV. 考 按

Antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) に働く K 細胞, natural cell mediated cytotoxicity

表 3 Sjögren 症候群, RA 患者の NK 活性

Disease	No. of case	Sex	NK activity(%)	
			Patients	Control
SjS	4	F	11.95±4.29SD*	39.83±7.95SD
SjS+CTD	4	F	13.47±5.96SD*	37.13±4.88SD
SjS+RA	11	F	15.22±14.23SD**	30.40±7.15SD
RA	21	F	48.39±23.56SD****	33.86±4.23SD
	8	M	37.51±19.65SD****	37.91±5.60SD
	29	Total	44.91±22.57SD***	35.47±4.50SD

*p<0.001, **p<0.01, ***p<0.05, ****p<0.05 : disease versus control. *****p<0.001 : RA patients versus patients with SjS, SjS+CTD and SjS+RA.

表 4 SjS, RA 患者における治療薬の NK 活性に及ぼす影響

Disease	Therapy†		No. of case	Sex	NK activity(%)
	Prednisolone	Gold			
SjS	—	—	2	F	8.85±3.75SD
	+	—	2	F	15.05±1.63SD
SjS+CTD	—	—	3	F	9.50±8.88SD
	+	—	1	F	19.10
SjS+RA	—	—	8	F	21.04±19.15SD
	+	—	2	F	10.95±1.91SD**
	—	+	1	F	20.90
RA	—	—	4	F	44.40±15.50SD*
	—	—	3	M	27.93±14.39SD
	—	—	7	Total	37.34±16.33SD
	+	—	6	F	39.67±22.63SD
	+	—	1	M	53.80
	+	—	7	Total	40.77±20.25SD
	—	+	11	F	61.26±24.18SD***
	—	+	4	M	40.63±23.87SD
	—	+	15	Total	56.27±24.95SD***

**p<0.001; RA patients versus patients with SjS, SjS+CTD and SjS+RA without gold and prednisolone.

**p<0.05; SjS+RA patients with prednisolone versus patients without prednisolone.

***p<0.05; RA patients with gold versus without gold.

† All the patients were divided into three groups according the therapeutical manner, a) patients without prednisolone and gold, b) patients on prednisolone (5-25 mg daily) and c) patients on gold(10-50 mg monthly).

city (NCMC) に働く NK 細胞の性状については、標的細胞の違いや用いる抗体等に報告者間に食い違いがみられ、不明確な点が多い。この両者とも IgG Fc レセプター保有細胞だと考えられており、Fc レセプター保有細胞の免疫反応における重要性が明らかにされつつある現

在、その機能・性格を明らかにして行くことはきわめて重要なことと言えよう。とくに、NK 活性は、ウイルス感染や腫瘍・移植免疫・老化等と強い関連性が示唆されており、免疫監視機構のホメオスタシスの維持に重要であると考えられている。著者らはすでに代表的な全身

図 1 月間金塩投与量と NK 活性との関係

性自己免疫疾患である SLE で、NK 活性が有意に低下していることを明らかにしたが^{1,3)}、今回同様な疾患である一面、また異なった面も数多く併せもつ SjS において、NK 活性が低下している結果が得られたことは興味深いものがある。SjS では悪性リンパ腫の合併が高頻度にみられることが知られてるが、このような現象と NK 活性の低下が一部関係している可能性がある。

SLE の場合と異なり、SjS の場合は血清中に抗 NK 活性が認められなかったこと、immune complex が低値であったことは、液性因子の関与よりも SjS ではむしろ NK 細胞自身の欠陥に基づくと考えるのが妥当であろうが、なおこの仮説の正当性を確立するには、さらなる研究が必要となろう。

RA で NK 活性の上昇傾向がみられたことは、RA 末

Effector to target cell ratio was 10:1 and interferon was added in the well at final concentration of 5-625 unit/ml.

Incubation time was 4 hrs.

図 2 インターフェロンの NK 活性に及ぼす影響

梢血にみられる Fc レセプター保有細胞の増加あるいは ADCC 活性の上昇と一部関連するものがある可能性もあるが、今回のわれわれのデータからは、むしろ治療として使用されている金製剤の影響が大きいと考えられた。preliminary なデータであるが、*in vitro* でも金製剤は NK 活性を上昇させる傾向があり、これらの NK 活性上昇作用が、いかんして、RA の活動性を抑制する作用と関連づけられるのか、金製剤の作用機序に関して新たな視点を投げかけるものへと発展するかもしれない。

最後に、インターフェロンの NK 活性上昇作用が、RA・SjS・SLE の末梢血リンパ球に対しては効果が少なかったことには、種々の可能性が考えられる。第一に、これらの疾患が一般にウイルス感染に対して抵抗性が弱いことから、リンパ系細胞のインターフェロンに対する反応性そのものが低下していること。あるいは何らかの刺激により、流血中で、インターフェロンが産生され、新たにインターフェロンを加えても反応する余地が少な

表 5 血清処理の NK 活性に及ぼす影響

patients	NK activity ¹⁾		% suppression ²⁾	Cytotoxicity(%) ³⁾ against normal lymphocytes
	C(+)	C(-)		
SjS	T.S. 45.5	57.2	20.5	25
	A.H. 37.4	48.2	22.5	15
RA	M.Y. 54.1	52.8	-2.5	10
	S.O. 52.4	65.2	13.7	17
SLE ⁴⁾	R.S. 22.6	57.4	64.3	23
	K.K. 38.5	56.1	43.2	27
	K.E. 33.9	53.4	40.7	20
Control	59.6	70.8	13.8	3

- 1) Normal lymphocytes were pretreated with disease sera and rabbit complement(C(+)) and used as effector cells in NK assay. NK activity of the treated cells were compared with that with the cell treated with disease sera in the absence of complement(C(-)).
- 2) % suppression was calculated as follows: % suppression =
- $$\frac{{}^{51}\text{Cr release(C(-))} - {}^{51}\text{Cr release(C(+))}}{{}^{51}\text{Cr release(C(-))} - \text{spontaneous } {}^{51}\text{Cr release}} \times 100$$
- 3) % cytotoxicity was evaluated by trypan blue dye exclusion test.
- 4) The SLE sera were 1 to 64 fold diluted. Others were undiluted.

くなっていること、血中にインターフェロンの作用を阻止する物質が存在し、それがリンパ球に結合して、イン

ターフェロンの作用をブロックすることなどが考えられよう。

文 献

- 1) 後藤 真, 谷本潔昭, 堀内淑彦: 自己免疫疾患の natural cell mediated cytotoxicity, 1. SLE 患者の natural cell mediated cytotoxicity 機能と抗リンパ球抗体. 日本臨床免疫学会会誌, 4: 295, 1981.
- 2) 谷本潔昭, 堀内淑彦, 後藤 真: SLE 患者の natural cell mediated cytotoxicity. 厚生省特定疾患自己免疫疾患調査研究班昭和 54 年度研究業績, 123~129, 1980.
- 3) Goto, M., Tanimoto, K. and Horiuchi, Y.: Natural cell mediated cytotoxicity in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum., 23: 1274~1281, 1980.
- 4) 大藤 真, 他: シェーグレン病診断基準. 厚生省特定疾患シェーグレン病調査研究班昭和 52 年度研究業績, 6, 1978.
- 5) Ropes, M.W., et al.: Revision of diagnostic criteria for rheumatoid arthritis. Bull. Rheum. Dis., 9: 175~176, 1958.
- 6) Aikawa, T., Mitamura, T., Tanimoto, K. and Horiuchi, Y.: Detection of circulating immune complexes by using human red blood cells. J. Lab. Clin Med, 94: 202~216, 1979.