担癌患者血清中の NK 活性抑制因子に関する分析的研究

仙 場 敬 三・勝 沼 英 宇・池 田 晃・文 屋 学*

荒 谷 英 二*・石 谷 邦 彦*・漆 崎 一 朗*

Serum suppressive factor (s) of natural killer activity in cancer patients

Keizo Senba, Hideyo Katsunuma, Akira Ikeda*, Manabu Bunya*,
Eizi Araya*, Kunihiro Ishitani*, Ichiro Urushizaki*

Department of Geriatric Medicine, Tokyo Medical College

**Fourth Department of Internal Medicine, Sapporo Medical College*

【Summary】

It is assumed that natural killer (NK) activity plays a significant role in immune surveillance mechanisms against cancer. In this regard, the present report describes experiments designed to investigate NK activity in cancer patients. Serum factor (s) involved in the modulation of NK mechanisms were also attempted to be determined.

Two groups were chosen for examination, i.e., a cancer patient group and a normal control group. NK activity was examined in patients with various untreated cancers. Comparison of the cancer patient group with normal controls revealed significant differences, with the patient group having lower NK activity.

Sera from cancer patients revealed suppression of NK activity *in vitro*. The active moiety was present in a high molecular weight fraction which eluted in the void volume of a Sephadex G-200 column. This fraction obtained from the sera of the cancer patients was active at concentration of 1.2 mg/ml, while the fraction prepared as control from normal sera showed no suppression. This fraction was further analysed by DEAE-sephacel chromatography from which suppressive factor (s) were separated.

It was concluded from the findings of PAGE and immunoelectrophoresis that α_2 -macroglobulin is a suppressive factor on NK activity in cancer patients.

Key words : cancer patients

serum suppressive factor (s)

α_2 -macroglobulin

NK cell

【概 要】

近年、生体の腫瘍に対する防御機構のひとつとして、いわゆる natural killer (NK) 現象が重要視されている。著者らは、未治療がん患者末梢リンパ球のNK活性を測定し、その低下を認めるとともに、がん患者血清が正常リンパ球のNK活性を抑制する作用のあることを見出した。そこで、がん患者血清中の抑制因子を分析する目的で、Sephadex G-200 column chromatography および DEAE sephacel chromatography を用いてがん患者血清から抑制分画を分離した。さらに、polyacrylamide gel electrophoresis および immunoelectrophoresis を実施し、抑制因子の本体が α_2 macroglobulin であることを認めた。

I. 緒 言

従来より、T 細胞系、マクロファージが腫瘍に対する免疫監視機構の主体と考えられてきたが、最近、非感作動物のリンパ球がある種の腫瘍細胞に障害性を示すことから natural killer (NK) 細胞と呼称され、ひとつの effector 機構の役割を果たしていると推察されている^{1,2)}。これはヌードマウスの腫瘍発生率が正常マウスのそれと差異がないこと、移植した異種腫瘍の増殖に抵抗性を示すこと³⁾、さらに、NK 活性の欠如したページマウスに腫瘍発育および転移率が正常対照マウスよりも高いこと⁴⁾ などからこの方面での重要性が指摘されている。一方、ヒトにおいてはNK細胞の in vivo における役割はほとんど不明である。これまで一般的にヒト悪性腫瘍患者でNK活性が低下しているとの報告が多い^{5,6)}が、各々の報告に指摘される問題点も少なくない。さらに、このNK活性低下の機序に関してはなお明らかではない。そこで今回著者らは、消化器癌患者を中心に、患者末梢リンパ球のNK活性の変動と患者血清のNK現象に及ぼす影響を検討し知見を得たので報告する。

II. 研究方法

1. 対 象

血液生化学検査、放射線および超音波検査、生検により診断し得た未治療の進行胃癌11例、肝癌9例、脾癌3例、急性肝炎2例、慢性肝炎3例と、対照としての健康正常人15例の末梢血リンパ球と血清を用いた。血清は新鮮血清、または -70°C 保存血清を用いた。

2. NK 活性の assay 方法

Herberman らの方法による ^{51}Cr short release assay により実施した。すなわち、ヘパリン採血ヒト末梢血を Ficoll-Isopaque 比重遠心法にてリンパ球を分離採取し

た。さらに、RPMI 1640 (10% FCS) にて3回洗浄後、Falcon plastic tissue culture flask にて室温1時間 incubation, adherent cell を除去後 $1 \times 10^7/\text{ml}$ に調整した。その $100 \mu\text{l}$ を microplate に triplicate で入れ、これを effector 細胞とした。標的細胞としたヒト慢性骨髄性白血由来培養株 K562 は、NIH Dr. Herberman より供与を受け実験に使用した。この細胞を培養液にて 1×10^6 個/ $200 \mu\text{l}$ に調整、これに対し $50 \mu\text{Ci}$ の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を添加、 37°C 2時間 incubation ^{51}Cr の標識を実施した。その後4回洗浄し、その $1 \times 10^4/40 \mu\text{l}$ を effector 細胞に加えた (effector 細胞 (E): 標的細胞 (T) = 100:1)。5% CO_2 incubation にて 37°C 4時間 incubation 後遠心、その上清中の放出 ^{51}Cr を γ -scintillation counter にて測定し、% cytotoxicity は次式にて算出した。

% cytotoxicity =

$$\frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximum release} - \text{spontaneous release}}$$

このときの spontaneous release は、effector 細胞を加えずに、target 細胞の単独培養終了時自然に放出される ^{51}Cr の量を示す。maximum release は、 ^{51}Cr を標識した target 細胞から放出される最大限の ^{51}Cr の量であり、1% NP 40 を target 細胞に添加し作製した。本法では spontaneous release は maximum release の 10% 以下であった。

3. 各種癌患者血清のNK活性に及ぼす影響の検討法

1) 被験血清の添加濃度に関する検討法

NK assay は II-2 に準じ、正常人 adherent cell 除去リンパ球を effector 細胞として行った。添加血清は、正常人2例の血清および2症例の肝癌血清を各々あらかじめ 56°C 30分間非働化後使用した。各々の血清を終濃度 10%、20%、30% となるように添加し NK 活性に及ぼす影響を検討し、% cytotoxicity は II-2 の式に準じ

experimental release を被験血清存在下のものとした。

2) Effector 細胞と被験血清との preincubation による影響の検討法

NK assay は II-2 に準じて実施した。被験血清は正常人血清と肝癌血清とした。その際、effector 細胞とした正常人 adherent cell 除去リンパ球を 10% 濃度の被験血清を含む培養液に浮遊させ、37°C に 1 時間から 24 時間 preincubation し、その後 3 回洗浄し assay に用いた。% cytotoxicity も II-2 に準じ、experimental release を被験血清と preincubation した effector 細胞を用いた場合の ^{51}Cr の放出の値をもって算定した。

3) 各種疾患血清の NK 活性に及ぼす影響の検討法

対象の項で記載した各種疾患患者血清を終濃度 10% に調整した培養液に正常人 adherent cell 除去リンパ球を浮遊させ、37°C 1 時間 preincubation し effector 細胞とし、3-2) に準じ assay を実施し、その影響を検討した。

4. NK 活性抑制因子の分析法

3-3) により検討した各種疾患患者血清のうち最も強い抑制作用を示した肝癌血清を選び、以下の方法で抑制因子の分析を行った。

1) Sephadex G-200 gel filtration による解析法

あらかじめ 0.05 M phosphate buffer saline pH 7.4 で平衡化した Sephadex G-200 gel を column size 2.6 × 100 cm の column に充填し、流速 10 ml/hr として filtration を実施した。溶出は upward flow にて行い 3 ml ずつ分画採取し、O.D. 280 nm の吸光度を測定した。さらに、各分画を Lowry 法にて蛋白量を測定し、その後、濃縮あるいは希釈して蛋白量を 1.2 mg/ml に調整し、培養液に透析後各分画毎 3-2) の方法で NK assay を行い、その影響を検討した。

2) DEAE sephacel による解析法

4-1) により判定された抑制分画を濃縮し、0.01 M Tris HCl pH 8.8 にて一昼夜透析した後、DEAE sephacel chromatography を実施した。DEAE sephacel は 0.01 M Tris HCl pH 8.8 で膨潤させ、column size 1 × 30 cm の column に充填し十分平衡化した後、試料を apply し同 buffer の 0 から 0.5 M NaCl の塩濃度勾配により chromatography を実施し、溶出 pattern より 6 分画に分画した。さらにこの分画を透析濃縮し、Lowry 法にて蛋白量を測定後に 1.0 mg/ml に調整し、培養液に透析後各分画を 3-2) の方法で NK assay を行い、その影響を検討した。

3) polyacrylamide gel 電気泳動法

6% polyacrylamide gel を作製し、平板電気泳動装置で 200 V 3 時間泳動した。染色は coomassie brilliant blue R 250 で行った。

4) 免疫電気泳動

Gel は 1.2% agar とし、1.3 mm の厚さでガラス平板上に作製した。各試料を apply した後 4 mA で 1 時間の泳動、その後 gel の溝に抗ヒト全血清ウマ抗血清、抗 α_2 macroglobulin ウサギ抗血清を添加し、約 20 時間後に沈降線を判定した。

III. 結果

1. 進行胃癌および肝癌患者末梢リンパ球の NK 活性

正常人 15 例、癌患者 16 例の末梢リンパ球の NK 活性を図 1 に示した。各々の平均は正常人 $51.3 \pm 11.7\%$ 、癌患者 $28.4 \pm 10.0\%$ と癌患者群で有意の低下を認めた。 $(p < 0.001)$

図 1 Natural cytotoxicity of lymphocyte from normal donors and patients with gastric cancer

図 2 Effects of serum on NK activity

図 3 Effects of serum on NK activity

2. 血清の添加濃度による NK 活性への影響

正常人 2 例および胃癌患者 2 症例の血清を非働化し、終濃度 10%, 20%, 30% となるように添加し NK 活性への影響を検討したところ、図 2 に示すように、正常人 2 例はいずれの濃度においても非添加の場合と有意の差を認めなかった。一方、胃癌患者 case 1 の血清では、添加濃度 10% では % cytotoxicity 50.1% のものが 43.8%, 20% で 38.9% に、30% で 32.4% に減少させる抑制効果を認めた。また胃癌患者 case 2 では、添加濃度 10% で % cytotoxicity が 27.6%, 20% で 25.2%, 30% で 22.1% に減少させる抑制効果が認められた。胃癌患者血清のように NK 活性の抑制を示す場合、培養液中の濃度 10% ですでにそれが出現し、以後徐々に濃度依存性に抑制効果が増強していた。

図 4 Effect of sera from normal donors and patients with various cancer of digestive organ against natural cytotoxicity

3. Effector 細胞を血清と preincubation させた場合の NK 活性への影響

図 3 の左端のカラムに示す 10% の血清添加で % cytotoxicity 41.2% の胃癌血清を使用し、effector 細胞をあらかじめ preincubation した場合 closed circle に示すように incubation time 1, 6, 12, 24 時間で各々 40.1%, 34.8%, 38.6%, 43.3% の % cytotoxicity を示した。すなわち、1 時間の preincubation では添加の場合と同程度の % cytotoxicity であり、6 時間 preincubation した場合に最大の抑制効果を示していた。

4. 各種癌患者血清の NK 活性に及ぼす影響

各種癌血清の正常人より採取した effector 細胞を用いた NK 活性への影響を図 4 に示した。対照とした正常人血清の添加では、% cytotoxicity $53.2 \pm 4.6\%$ に対し肝癌群 $34.3 \pm 9.7\%$ 、胃癌群で $35.5 \pm 9.5\%$ 、膵癌 $36.1 \pm 6.9\%$ であり、明らかに癌血清群で % cytotoxicity 低下を認めた。($p < 0.01$)

図 5 Elution profile of serum from patient with hepatoma gel filtrated on G-200 and effect of respective fractions against natural cytotoxicity

図 6 Elution pattern of DEAE sephacel chromatography of 1st peak obtained from Sephadex G 200 gel filtration (column size 1×30 cm Buffer 0.01 M Tris-HCl pH 8.8 gradient system 0-0.5 M NaCl)

5. NK 活性の抑制作用を示す血清の分析

1) Sephadex G-200 gel filtration と各分画の NK 活性への影響

抑制作用を示した肝癌血清の Sephadex G-200 gel filtration pattern を図 5 に示した。closed circle に示すように、O.D. 280 nm の吸光度による分画は 3 峰性を呈し、一方、open circle に示す各分画の NK 活性への影響では、tube No. 10 から 15 までは buffer 部分を対照としてみても void volume に一致する部分に抑

制効果を認め、tube No. 16 から 18 までは抑制分画とした。さらに、tube No. 35 近傍ではむしろ NK 活性の増強を認めた。

2) Sephadex G-200 gel filtration により得られた抑制分画の DEAE sephacel chromatogram とその NK 活性への影響

Sephadex G-200 gel filtration により認められた void volume に一致する抑制分画の DEAE sephacel chromatography を実施したところ、図 6 に示すように

6 峰性の pattern を呈し、図のように 6 分画に分け、各々の NK 活性への影響を検討した。その結果、図の斜線で示した Fraction 5 が NK 活性を 1 mg/ml の蛋白濃度で 50% の抑制効果を認め、他の分画ではいずれも抑制効果を認めなかった。

3) Fraction 5 の polyacrylamide gel 電気泳動と免疫電気泳動所見

図 7 に示すように Fraction 5 は、両分析法でともに α_2 macroglobulin の所見を示していた。

IV. 考 按

NK 現象の in vivo における腫瘍抵抗性の直接的証明は、いまだ明確にされていない現況である。しかし、Herberman ら²⁾および Becker ら⁷⁾は、動物実験の上で腫瘍の増大・抑制と NK 活性の相関を検討し、NK 細胞が抗腫瘍性に作用することを報告している。また、Kiessling ら⁸⁾は、NK 現象が遺伝的支配をうけていることから、種々の mouse を交配させ、YAC 細胞に対する NK 活性の low responder mouse と high responder mouse の F₁ を作製し、それらの NK 活性と in vivo における腫瘍の増殖・抑制が平行する結果を得、同様に NK 細胞の抗腫瘍性を支持している。一方、ヒトにおいても NK 現象の腫瘍抵抗性に関してのいくつかの報告があるが、癌患者の NK 活性の評価については一定の

見解が得られていない。Pross ら⁵⁾は、種々の癌患者において、NK 活性が低下傾向を示しその中で腫瘍が局限している場合は NK 活性の低下がみられないが、広範な転移を伴う場合に低下してくることを認め、NK 現象が腫瘍の大きさと密接な相互関係にあることを報告している。また、Takasaki ら⁶⁾も同様に多くの癌症例を TNM 分類と治療法により分類し、末期癌患者群および化学療法を受けた群で NK 活性が低下していることを報告している。これらに対し、Cannon ら⁹⁾および西条¹⁰⁾の報告では、肺癌・乳癌・大腸癌などで NK 活性の有意な低下を認めないとしている。しかし、これらの場合、組織型や病期による差などについて検討の余地があると思われる。今回我々は、未治療の進行消化器癌患者の NK 活性を検討したところ、健康正常人群に比較し明らかに有意の NK 活性低下がみられ、in vivo における腫瘍抵抗性の減弱を示唆する結果を得た。したがって、一般に癌患者の NK 活性が低下していることは事実と思われる。このように癌患者の NK 活性低下の現象が認められてきた現在、その機序に関する報告は少ない。これまで知られているものは、ひとつは直接的に NK 細胞の機能を阻止するものとして多くの化学療法剤や prostaglandin E があげられる。また、Hochman ら¹¹⁾および Santoni ら¹²⁾により NK suppressor cell の概念が呈示され、その本態が macrophage であることが示唆されている。また、この suppressor cell を誘導する物質として hydrocortison, pyran-copolymer, corynebacterium pavirus, adriamycin, glucan など^{13,14)}が報告されている。さらに、Silica, caragenan による macrophage の accessory role の block, tumor 局所への NK 細胞の shift, 遺伝的背景など担癌生体における NK 活性低下の機序は必ずしも単純な機構ではないと思われる。最近、Nair ら¹⁵⁾は担癌 mouse の血清が syngeneic な mouse の NK 活性を抑制することを、また、Lavrovsky ら¹⁶⁾は rat を用いた実験で、その homologous な血清に NK 活性抑制作用を認め、担癌生体の NK 活性低下の機構に血清中の

図 7A PAGE-pattern of Fr 5 from DEAE-sephacel chromatography

図 7B Immunoelectrophoresis of Fr 5 from DEAE-sephacel chromatography

物質が関与するという概念が登場した。今回我々がヒトにおいて検索したところ、正常人末梢リンパ球を癌患者血清で処理した場合、明らかに NK 活性の抑制を認めた。この抑制作用は、NK 細胞群側に働き、ある至適時間の接触により NK 細胞群自身に変化が惹起されると推測される。この抑制作用を示す血清から種々の生化学的方法で抑制物質を解析したところ、それは α_2 macroglobulin と同定された。漆崎ら¹⁷⁻¹⁹⁾は、これまで癌患者血清中の癌に特有な免疫抑制因子として酸性の等電点を有する α_2 macroglobulin を報告している。この acidic α_2 macroglobulin は、 α fetoprotein の免疫抑制作用²⁰⁾と同様に非特異的 suppressor cell を誘導することが機序として認められている。したがって、この免疫抑制性

acidic α_2 macroglobulin が NK 活性を同様に抑制する可能性は十分考えられるのである。また最近、Hudig ら²¹⁾により、 α_1 antitrypsin などの血清中の antiprotease がヒトの NK 活性を抑制すると報告されており、 α_2 macroglobulin も antiprotease のひとつである点から興味深い事実と思われる。今後さらに、NK 活性抑制因子としての癌患者血清中の α_2 macroglobulin の本質と作用機序について検討を重ねたいと考える。

V. 結 語

癌患者 NK 活性の低下の一因として、癌患者血清中に存在する α_2 macroglobulin がその主体的役割を果たしていることを見出した。

文 献

- 1) Kiessling, R., Klein E., Pross, H., Wigzell, H. : "Natural" Killer cell in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells, Characteristics of the Killer cell. Eur. J. Immunol. 5 : 117~121, 1975.
- 2) Herberman, R.B., Nunn, M.E., Lavrin, D.H. : Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. Int. J. Cancer 16 : 216~229, 1975.
- 3) Stutman, O. : Tumor development after 3-methyl cholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. Science 183 : 534~536, 1974.
- 4) Talmadge, J.E., Meyers, K.M., Prieur, D.J. & Starkey, J.R. : Role of NK cells in tumor growth and metastasis in beige mice. Nature 284 : 662~624, 1980.
- 5) Pross, H.F., Baines, M.G. : Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumour target cells. I. The effect of malignant disease. Int. J. Cancer 18 : 539~604, 1976.
- 6) Takasugi, M., Ramseyer, A., Takasugi, J. : Decline of natural nonselective cell-mediated cytotoxicity in patients with tumor progression. Cancer Res. 37 : 413~418, 1977.
- 7) Becker, S., Klein, E., : Decreased "Natural Killer" effect in tumor-bearing mice and its relation to the immunity against oncornavirus-determined cell surface antigens. Eur. J. Immunol. 6 : 892~898, 1976.
- 8) Kiessling, R., Petranyi, G., Kein, G., Wigzell, H. : Genetic variation of *in vitro* cytolytic activity and *in vitro* rejection potential of non-immunized semisyngeneic mice against a mouse lymphomaline. Int. J. Cancer 15 : 933~940, 1975.
- 9) Cannon, G.B., Bonnard, G.D., Djeu, J., West, W.H., Herberman, R.B. : Relationship of human natural lymphocyte-mediated cytotoxicity to cytotoxicity of breast cancer derived target cells. Int. J. Cancer 19 : 487~497, 1977.
- 10) 西条長宏 : 人末梢リンパ球 natural killer 活性の分析と原発性肺癌、転移性肺腫瘍における変動。日本癌治療学会誌 15 (3) : 362~374, 1980.
- 11) Hochman, P.S., Cudkowicz, G. : Suppression of natural cytotoxicity by spleen cells of hydrocortisone treated mice. J. Immunol. 123 : 968~976, 1979.
- 12) Santoni, A., Riccardi, C., Barlozzari, T. : Herberman, R.B. : Inhibition as well as augmentation of mouse NK activity by pyran copolymer and adriamycin. natural cell-mediated immunity against tumors, academic press, 753~763, 1980.
- 13) Brunda, M.J. Herberman, R.B., Holden, H.T. : Inhibition of murine natural killer cell activity by prostaglandins. J. Immunol. 124 : 2682~

- 2687, 1980.
- 14) Lotzova, E. : Parvum-mediated suppression of the phenomenon of natural killing and its analysis. *Natural cell-mediated immunity against tumors*, academic press, 735~752, 1980.
- 15) Nair, P.N.M., Fernandes, G., Onoe, K., Day, N.K., Good, R.A. : Inhibition of effector cell functions in natural killer cell activity (NK) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in mice by normal and cancer sera. *Int. J. Cancer* 25 : 667~677, 1980.
- 16) Lavrovsky, V.A., Viksler, V.K.H. : Natural killer activity of wistar rat spleen cells. Blocking effect of homologous sera. *Immunology* 41 : 541~545, 1980.
- 17) Urushizaki, I., Ishitani, K. Nagai, T., Gocho, Y. : Koyama, R. : Immunosuppressive factors in serum of patients with gastric carcinoma. *Gann* 68 : 413~421, 1977.
- 18) 漆崎一朗, 石谷邦彦, 長井忠則, 近藤 敦, 吉田憲基, 赤沢修吾, 前口邦雄, 呉 禎吉, 新津洋司郎 : 肝癌患者血清中の非特異的免疫抑制因子にかんする研究. *日本消化器病学会雑誌* 74 (7) : 910~921, 1977.
- 19) 石谷邦彦, 本多利雄, 竹内秀一, 池田 晃, 幸田久平, 井原康二, 呉 禎吉, 漆崎一朗 : 癌特徴的免疫抑制 α_2 macroglobulin 分画の生化学的分析とその作用機序. *消化器と免疫* 3 : 167~171, 1977.
- 20) 石谷邦彦, 前口邦雄, 呉 禎吉, 本多利雄, 竹内秀一, 漆崎一朗 : α -fetoprotein による suppressor cell の誘導. *消化器と免疫* 2 : 49~54, 1979.
- 21) Hudig, D. Haverty, T., Fulcher, C., Redelman, D., Mendelsohn, J. : Inhibition of human natural cytotoxicity by macromolecular antiproteases. *J. Immunol.* 126 : 1569~1574, 1981.
-