維持透析患者の細胞性免疫

土肥 和 紘 高井 正秀 山田 宏治 杉本 和夫
 藤本 真一 藤本 順一郎 藤井 謙裕 橋本 俊雄
 石川 兵衛

奈良県立医科大学第1内科

(昭和62年6月29日受付)

key words : ADCC 活性, AMLR, 維持透析患者, NK 活性, サプレッサーT細胞機能

〈要旨〉

維持透析 (HD) 患者では結核罹患率や発癌率が高いという事実から, 最近では HD 患者における細胞性免疫異常が注目されている。そこでわれわれは HD 患者の natural killer (NK) 活性, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 活性, autologous mixed lymphocyte reaction (AMLR) および concanavalin A 誘導サプレッサーT細胞 (Con A-Ts) 機能について検討し, 併せてモノクローナル抗体を用いてリンパ球サブセットを解析した。対象は30例のHD患者であり, 健常成人100例を対照に選んだ。NK および ADCC 活性は標的細胞にそれぞれ K562 細胞, ニワトリ赤血球を用いた ^{51}Cr 遊離法の測定によった。AMLR の評価は non T細胞に対する T, T_γ および T non γ 細胞の反応性, Con A-Ts 機能は pokeweed mitogen で刺激された一定健常人リンパ球の増殖能に対する Ts 細胞の抑制効果によった。リンパ球サブセットの解析は OKT および Leu シリーズによるフローサイトメトリーによった。HD 患者の NK 活性, ADCC 活性はそれぞれ $14.5 \pm 1.6\%$, $20.7 \pm 2.2\%$ であり, 健常対照の $30.9 \pm 1.4\%$, $34.8 \pm 2.2\%$ に比して有意に低下していた。HD 患者の AMLR は T, T_γ , T non γ のすべてが健常対照に比して有意に低下していた。一方, HD 患者の Con A-Ts 機能は健常対照と有意の差を示さなかった。リンパ球サブセットの解析では健常対照に比して HD 患者の Leu 3a, OKM1, Leu 11a, OKIa1, HLA-DR 陽性細胞出現率が有意の増加を, Leu 2a 陽性細胞出現率が有意の減少を示した。しかし HD 患者の OKT3, OKT4, OKT8, Leu 4 および Leu 7 陽性細胞出現率は健常対照と明らかな差を示さなかった。つまり HD 患者については NK 活性, ADCC 活性および AMLR が低下しているので, 腫瘍免疫監視, ウイルス感染防御や自己認識などに機能異常が存在するものと考えられる。さらに OKM1, Leu 7 および Leu 11a 陽性細胞出現率は減少していないので, NK 活性の低下は量的な異常ではなく質的な異常によるものと思われる。

Cellular immunity in patients undergoing maintenance hemodialysis

Kazuhiro Dohi, M. D., Masahide Takai, M. D., Hiroharu Yamada, M. D., Kazuo Sugimoto, M. D., Shinichi Fujimoto, M. D., Junichiro Fujimoto, M. D., Yoshihiro Fujii, M. D., Toshio Hashimoto, M. D., Hyoe Ishikawa, M. D.

The First Department of Internal Medicine, Nara University.

The effect of hemodialysis on cell-mediated immunity was investigated in 30 hemodialysis patients. Several parameters of cell-mediated immunity, such as natural killer (NK) activity, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), concanavalin A-induced suppressor T cell function (Con A-Ts), autologous mixed lymphocyte reaction (AMLR) and analysis of lymphocyte subsets using monoclonal antibodies by fluorescence-activated cell sorter, were assessed in these patients.

The NK activities of NK cells and ADCC were significantly decreased in hemodialysis patients compared with normal subjects. Moreover, AMLR of whole T cells, T_γ cells and T non γ cells were significantly decreased in hemodialysis patients compared with normal subjects. However, the Con A-Ts in hemodialysis patients was

土肥 和 紘 奈良県立医科大学第1内科
 〒634 橿原市四条町 840 (07442-2-3051)

normal.

Peripheral lymphocyte subsets were measured using

monoclonal antibodies (OKT and Leu series). The percentage of Leu3a, OKM1, Leu11a, OKIa1 and HLA-DR positive cells were significantly higher in the hemodialysis patients, whereas the percentage of Leu2a positive cells was significantly decreased. In contrast, there was not such a big difference in the percentage of OKT3, OKT4, OKT8, Leu4 and Leu7 positive cells between the two groups.

We also studied the influence of blood transfusion on cellular immunity in hemodialysis patients. A marked decrease in AMLR between T γ and non T cells was observed in blood transfused patients.

Concerning other cellular immunological functions, no abnormal findings were observed in blood transfused patients.

These results indicate that hemodialysis patients may have defects in immunological surveillance for neoplasma, defense against viral infections and the self-recognition mechanism.

緒言

従来から結核や癌の罹患率が高い^{1,2)}とか、臓器移植の拒絶反応が弱い³⁾などの事実から維持透析 (HD) 患者には細胞性免疫の低下が存在すると考えられてきた。機能的には、末梢血リンパ球数あるいは分画、遅延型皮膚反応およびリンパ球幼若化反応などが検討されており、HD 患者においては特にT細胞機能低下が指摘されている⁴⁾。今回われわれは、HD 患者の細胞性免疫をより詳細に検討する目的で、キラー細胞機能を natural killer (NK) 活性および antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 活性、サブプレッサーT細胞機能を一定健常人リンパ球の増殖能に対する concanavalin A (con A) 誘導サブプレッサーT細胞の抑制効果、自己認識過程を各種T細胞サブセット (T, T γ , T non γ) における autologous mixed lymphocyte reaction (AMLR) で検討し、併せてモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーによりリンパ球サブセットを解析した。

対象と方法

1. 対象

対象は奈良県立医科大学附属病院第1内科およびその関連病院に通院中の維持透析患者30例で、性別は男性10例、女性20例、年齢は29-62(平均43.2)歳であった。なお、対象の原疾患は全例が慢性糸球体腎炎であり、対象のHD期間、ヘモグロビン値、透析前BUN値および透析前クレアチニン値は表1に示すとおりである。

さらに、健常対照に健常成人100例を選んだ。性別は

男性58例、女性42例で年齢は18歳から59歳(平均27.1歳)であった。

2. 方法

1) NK 活性

NK 活性は ^{51}Cr 遊出法により測定した。ヘパリン加末梢血に5%シリカ懸濁液(日本抗体研究所製)を加え、37°C、60分間静置して単球を除去した。ついで Ficoll-Hypaque (Pharmacia 製) 比重遠心法により末梢血リンパ球(PBL)を分離した。培養液はRPMI 1640(日水製薬社製)に10 vol% のウシ胎児血清(FCS, Chimera Biomedics Corporation 製)、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の streptomycin (明治製薬社製)、10,000 U/dl の penicillin G (明治製薬社製)を添加して作成した。この培養液にPBLを $2 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度となるように浮遊させ、これを effector 細胞(e)とした。NK細胞に対する標的細胞(t)は慢性骨髄性白血病由来の培養株 K562 を使用した。 $5 \times 10^6/0.2 \text{ ml}$ の t に $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear 製) 1 ml (100 μCi) を加え、5% CO_2 、37°C下で60分間培養し t を標識した。ついで標識された t が $25 \times 10^4/\text{ml}$ の濃度となるように培養液中に浮遊させた。U底マイクロプレート(Corning社製)に $1 \times 10^4/0.04 \text{ ml}$ の t と $2 \times 10^5/0.1 \text{ ml}$ の e を分注し (e/t=20)、5% CO_2 、37°C中で4時間培養した。培養後、各ウェルから上清を Titertek supernatant collection system で採取し、遊離した ^{51}Cr 量をガンマシンチレーションカウンター (Packard, Model 5130) で測定した。NK 活性は次式で求めた。

$$\text{NK 活性}(\%) = (\text{実験 } ^{51}\text{Cr 遊離} - \text{自然 } ^{51}\text{Cr 遊離}) / (\text{最大 } ^{51}\text{Cr 遊離} - \text{自然 } ^{51}\text{Cr 遊離}) \times 100$$

なお、最大遊離は t を 1N の塩酸で処理した時の放射活性で、自然遊離は t のみを培養した時の放射活性で求めた。

2) ADCC 活性

ADCC 活性は Perlmann ら⁵⁾の方法に準じ、 ^{51}Cr 遊出法により測定した。単球除去後の PBL を前述の培養液に浮遊させ、リンパ球数が $5 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度となるよう

表 1 対 象

透析患者	30 例	(男性10例, 女性20例)
年齢	平均 43.2 歳	(29-62 歳)
透析期間	平均 5.2 年	(0.25-14.5 年)
ヘモグロビン値	平均 $7.6 \pm 1.7 \text{ g/dl}$	(5.0-12.9 g/dl)
血清総タンパク量	平均 $7.3 \pm 0.6 \text{ mg/dl}$	(5.4-8.7 mg/dl)
透析前 BUN 値	平均 $60.4 \pm 10.3 \text{ mg/dl}$	(43-84 mg/dl)
透析前クレアチニン値	平均 $10.1 \pm 2.2 \text{ mg/dl}$	(6.5-16.3 mg/dl)

に調整し、effector 細胞 (e) とした。 $2 \times 10^7/0.1 \text{ ml}$ のニワトリ赤血球 (CRBC) に 0.1 ml ($100 \mu\text{Ci}$) の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を加えて ^{51}Cr 標識 CRBC を作製し、標的細胞 (t) とした。次に、非働化したウサギ抗 CRBC 抗体 IgG (日本抗体研究所製) を PBS で 200 倍希釈後、その 1 ml を t に加えて 5 % CO_2 , 37°C で 30 分間培養した。培養後、t が $5 \times 10^5/\text{ml}$ となるよう培養液中に浮遊させた。そして U 底マイクロプレートに $5 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ の t と $25 \times 10^4/50 \mu\text{l}$ の e を各ウェルに分注した後 (e/t = 5), 5 % CO_2 , 37°C で 24 時間培養した。培養後、各ウェルから上清を Titertek supernatant collection system で採取し、遊離 ^{51}Cr 量をガンマシンチレーションカウンターで測定した。ADCC 活性は次式により求めた。

$$\text{ADCC 活性 (\%)} = (\text{実験 } ^{51}\text{Cr 遊離} - \text{自然 } ^{51}\text{Cr 遊離}) / (\text{最大 } ^{51}\text{Cr 遊離} - \text{自然 } ^{51}\text{Cr 遊離}) \times 100$$

なお、最大遊離は t の放射活性を直接測定することにより、自然遊離は CRBC を 10^6 個加えることにより測定した。

3) Con A-Ts 機能

まずヘパリン加末梢血を用い、Ficoll-Hypaque 液による比重遠心法で PBL を分離した。前述の培養液に PBL を $2 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度となるように調整して浮遊させ、さらにヒツジ赤血球 (SRBC, 日本抗体研究所製) を加えてロゼットを形成させた後、Ficoll-Hypaque 比重遠心法でロゼット形成細胞 (T 細胞) と非ロゼット形成細胞 (non T 細胞) を分離した。ついで SRBC に 0.17 M トリス緩衝液 (pH 7.2) を加える低張処理で SRBC を溶血させ、T 細胞を得た。この T 細胞を $1 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度となるように調整して培養液中に浮遊させた。その T 細胞を平底マイクロプレートに $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるように調整した con A (Pharmacia 社製) 0.02 ml の存在下および非存在下に 0.2 ml ずつ分注し、5 % CO_2 , 37°C の条件下で 48 時間培養した。培養後、 0.1 M の α -methyl-D-mannoside (Fluka 社製) を加えて con A を除去し、con A 誘導サプレッサー T 細胞 (Con A-Ts) を得た。また con A 無添加の非誘導 T 細胞を対照細胞とした。両者とも $1 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度となるよう調整して培養液中に浮遊させ、これらを刺激細胞とした。反応細胞は同一健康人の PBL ($1 \times 10^6/\text{ml}$) を用いた。反応細胞と刺激細胞をそれぞれ $0.1 \text{ ml}/\text{ウェル}$ ずつ混合し、培養液で $2.5 \mu\text{l}/\text{ml}$ になるように調整した pokeweed mitogen (PWM, GIBCO 社製) を各ウェルに $20 \mu\text{l}$ ずつ添加して 37°C , 5 % CO_2 中で混合培養した。また同時に、Con A-Ts および対照細胞はいずれも単独に、PWM を加えて培養した。培養 96 時間後に、 $0.25 \mu\text{Ci}$ の ^3H

-thymidine (Amersham 社製) を加えた。さらに 16 時間培養後、cell harvester (Labo Mash 社製) でリンパ球をガラスフィルターに吸着させ、 ^3H -thymidine の取り込みを液体シンチレーションカウンター (LS 7500, Beckman 社製) で測定した。Suppression index (SI) を下記の計算式で求め、Con A-Ts 機能の評価に用いた。

$$\text{SI} = (1 - \text{Con A-Ts の } \Delta\text{cpm} / \text{対照細胞の } \Delta\text{cpm}) \times 100$$

Con A-Ts の $\Delta\text{cpm} = (\text{Con A-Ts と健康人 PBL 混合培養時の取り込み}) - (\text{Con A-Ts 単独培養時の取り込み})$

対照細胞の $\Delta\text{cpm} = (\text{対照細胞と健康人 PBL 混合培養時の取り込み}) - (\text{対照細胞単独培養時の取り込み})$

4) AMLR

リンパ球の分離：ヘパリン加末梢血から前述した方法で単球を除去した PBL を分離した。分離後、E-rosette 法で T 細胞、non T 細胞を得た。

T γ および T non γ 細胞の分離：抗ウシ赤血球イエウサギ IgG 抗体 (日本抗体研究所製) で感作したウシ赤血球を、その濃度が 5 % となるように前述の培養液中に浮遊させた。つぎに分離した T 細胞が $5 \times 10^6/\text{ml}$ となるように培養液中に調整して浮遊させた後、等量のウサギ IgG 感作ウシ赤血球を加えて IgG receptor を持つ T 細胞 (T γ 細胞) と EA-rosette を形成させた。Rosette 形成後、Ficoll-Hypaque 法により T γ 細胞と T non γ 細胞とに分離した。

リンパ球混合培養：T 細胞、T γ 細胞および T non γ 細胞は培養液中の細胞数がいずれも $1 \times 10^6/\text{ml}$ となるように調整して 37°C , 5 % CO_2 の条件下で 24 時間静置し、これを反応細胞に用いた。つぎに mitomycin C (MMC, 協和発酵社製) をその濃度が $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように non T 細胞浮遊液に加え、 37°C , 5 % CO_2 の条件下で 30 分間培養し、刺激細胞とした。T 細胞、T γ 細胞、T non γ 細胞および non T 細胞を、T と non T, T γ と non T, T non γ と non T の組み合わせでそれぞれ $100 \mu\text{l}$ ずつの細胞を混合して、 37°C , 5 % CO_2 下で 144 時間培養した (AMLR)。同時に反応細胞である T 細胞、T γ 細胞および T non γ 細胞をそれぞれ $100 \mu\text{l}$ ずつ単独に 144 時間培養した (反応 T 細胞単独)。培養終了 24 時間前に $0.25 \mu\text{Ci}$ の ^3H -thymidine を各培養系に加え、 ^3H -thymidine の取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。

AMLR は次式によって求めた Δcpm で評価した。

$$\Delta\text{cpm} = (\text{AMLR の取り込み}) - (\text{反応 T 細胞単独の取り込み})$$

5) モノクローナル抗体による末梢血リンパ球サブセットの解析

表 2 HD 患者の NK 活性, ADCC 活性, Con A-Ts 機能

群別	NK 活性 (%)	ADCC 活性 (%)	Con A-Ts 機能 (%)
対照群	30.9±1.4	34.8±2.2	44.8±4.1
HD 群	14.5±1.6 **	20.7±2.2 **	42.3±4.2

** : p<0.01

表 3 HD 患者の AMLR

群別	T-nonT (cpm)	T γ -nonT (cpm)	T non γ -nonT (cpm)
対照群	20,819±2,373	13,769±800	21,957±2,643
HD 群	5,295±706 **	1,730±354 **	7,927±1,389 **

** : p<0.01

表 4 HD 患者のリンパ球サブセット解析
OKT シリーズによるリンパ球サブセット解析

群別	OKT3	OKT4	OKT8	OKIa1	OKM1	OKT4/8
対照群	68.3±1.2	41.2±0.8	26.5±0.7	14.7±0.8	13.0±0.9	1.63±0.45
HD 群	65.7±2.0	44.1±1.9	26.9±1.6	23.0±2.0 **	24.8±1.5 **	1.89±0.17

Leu シリーズによるリンパ球サブセット解析

群別	Leu2a	Leu3a	Leu4	Leu7	Leu11a	HLA-DR	Leu3a/2a
対照群	27.8±0.7	37.7±0.8	68.6±0.8	20.7±0.9	16.9±1.1	20.7±0.5	1.5±0.6
HD 群	25.1±1.7 *	43.8±1.7 **	67.3±1.9	18.0±1.7	23.7±2.0 **	35.9±2.6 **	2.1±0.2 **

* : p<0.05, ** : p<0.01

末梢血リンパ球サブセット分析は OKT シリーズ・モノクローナル抗体 (Ortho Diagnostic Systems Inc. 製) および Leu シリーズ・モノクローナル抗体 (Becton Dickinson Monoclonal Center Inc. 製) を用いたフローサイトメトリーによった。ヘパリン加末梢血 100 μ l を 100 μ l の PBS で希釈後、モノクローナル抗体 10 μ l を加え、4℃、30 分間静置した。静置後、lysing reagent (0.8% NH₄Cl, 0.5 mM EDTA, 0.1% KHCO₃) 2 ml を加えて赤血球を溶血させ、4℃の条件下で遠沈後、細胞を採取した。採取した細胞を PBS 1 ml に再浮遊させ、スペクトラム III (Ortho-mune) で解析した。

6) 細胞性免疫に対する輸血の影響をみるため以下のように対象を分けて検討した。1 度でも輸血を受けたことのある症例を輸血 (+) 群とし、1 度も輸血を受けていない症例を輸血 (-) 群とした、この両群の細胞性免疫を比較して輸血の細胞性免疫に及ぼす影響を検討した。

成績

1. NK 活性

HD 患者群の NK 活性は 14.5±1.6% であり、健常対照群の 30.9±1.4% に比し、p<0.01 で有意に低下していた (表 2)。

2. ADCC 活性

HD 患者群の ADCC 活性は 20.7±2.2% であり、健常対照群の 34.8±2.2% に比し、p<0.01 で有意に低下していた (表 2)。

3. Con A-Ts 機能

HD 患者群の Con A-Ts 機能は 42.3±4.2% であり、

健常対照群の 44.8±4.1% に比して有意の差を示さなかった (表 2)。

4. AMLR

HD 患者群における T, T γ および T non γ 細胞の AMLR はそれぞれ 5,295±706 cpm, 1,730±354 cpm, 7,927±1,389 cpm であり、健常対照群の 20,819±2,373 cpm, 13,769±800 cpm, 21,957±2,643 cpm に比していずれも p<0.01 で有意に低下していた (表 3)。

5. リンパ球サブセットの解析

OKT シリーズ：HD 患者群の OKIa1 陽性細胞出現率は 23.0±2.0% であり、健常対照群の 14.7±0.8% に比して有意に増加していた (p<0.01)。同様に OKM1 についても HD 患者群は 24.8±1.5% であり、健常対照群の 13.0±0.9% に比して有意の増加を示した (p<0.01)。一方、OKT3, OKT4, OKT8 の陽性細胞出現率および OKT4/8 比は HD 患者群と健常対照群との間に明らかな差を示さなかった (表 4)。

Leu シリーズ：HD 患者群における Leu 2a 陽性細胞出現率は 25.1±1.7% であり、健常対照群の 27.8±0.7% に比して有意に低下していた (p<0.05)。一方、Leu 3a 陽性細胞出現率については HD 患者群が 43.8±1.7% であり、健常対照群の 37.7±0.8% に比して有意の増加を示した (p<0.01)。また HD 患者群の Leu 3a/2a 比は 2.1±0.2 であり、健常対照群の 1.5±0.6 に比して有意の増加を示した (p<0.01)。Leu 4 および Leu 7 陽性細胞の出現率は両群間に明らかな差を示さなかった。HD 患者群の Leu 11a 陽性細胞出現率は 23.7±2.0% であり、健常対照群の 16.9±1.1% に比して有意に増加し

表 5 輸血の影響

輸血歴	NK活性	ADCC活性	Con A-Ts	AMLR(T)	AMLR(T γ)	AMLR(T non γ)
輸血+	13.6 $\pm$ 8.8%	18.8 $\pm$ 8.9%	50 $\pm$ 14%	3,299 $\pm$ 762 cpm	983 $\pm$ 142 cpm	5,230 $\pm$ 2,049 cpm
輸血-	15.0 $\pm$ 8.0	22.0 $\pm$ 13.3	37 $\pm$ 25	6,627 $\pm$ 913	2,227 $\pm$ 542	9,726 $\pm$ 1,694

輸血歴	OKT3	OKT4	OKT8	OKIa1	OKM1	OKT4/8
輸血+	65.8 $\pm$ 11.6	44.2 $\pm$ 11.3	27.1 $\pm$ 8.9	22.2 $\pm$ 10.8	24.4 $\pm$ 7.8	1.95 $\pm$ 0.34
輸血-	65.6 $\pm$ 9.7	44.1 $\pm$ 9.0	26.8 $\pm$ 8.8	23.6 $\pm$ 10.8	25.0 $\pm$ 8.4	1.84 $\pm$ 0.18

輸血歴	Leu2a	Leu3a	Leu4	Leu7	Leu11a	HLA-DR	Leu3a/2a
輸血+	24.2 $\pm$ 9.1	44.4 $\pm$ 10.4	68.5 $\pm$ 10.5	15.5 $\pm$ 5.7	21.1 $\pm$ 6.7	35.6 $\pm$ 12.7	2.23 $\pm$ 0.43
輸血-	25.6 $\pm$ 9.3	43.4 $\pm$ 7.9	66.5 $\pm$ 9.9	19.6 $\pm$ 10.8	25.4 $\pm$ 12.7	36.2 $\pm$ 14.9	1.93 $\pm$ 0.19

* ; p<0.05, ** ; p<0.01

ていた (p<0.01)。また, HD 患者群の HLA-DR 陽性細胞出現率は 35.9 $\pm$ 2.6%であり, 健常対照群の 20.7 $\pm$ 0.5%に比して有意の増加 (p<0.01)を示した(表 4)。

6. 細胞性免疫に対する輸血の影響

つぎに HD 患者の細胞性免疫に対する輸血の影響を検討した。表 5 に示したように, NK 活性, ADCC 活性, Con A-Ts 機能およびモノクローナル抗体を用いたリンパ球サブセット分析に対する輸血の影響については, 輸血歴の有無による明らかな相違が認められなかった。しかし AMLR については輸血 (+) 群の T 細胞および T γ 細胞の AMLR がそれぞれ 3,299 $\pm$ 762 cpm, 983 $\pm$ 142 cpm であり, 輸血 (-) 群の 6,627 $\pm$ 913 cpm, 2,227 $\pm$ 542 cpm に比して有意の低下を示した (T ; p<0.01, T γ ; p<0.05)。一方, T non γ 細胞の AMLR は輸血 (+) 群と輸血 (-) 群の間に有意の差がみられなかった。

考察

1. NK 活性

NK 細胞は特異的獲得免疫が作動する以前に発動する初期防御の一員であり, 生体の自然抵抗性, とくに癌の発生増殖に対し抵抗性を示すものとされている。HD 患者における NK 活性の低下についてはすでに Badger⁶⁾によって報告されているが, 今回の成績もそれを裏づけたといえる。発癌の免疫監視機構上重要な働きを持つ NK 細胞の機能低下は HD 患者における悪性腫瘍多発の原因となり得るものと考えられ, 悪性腫瘍発生率が HD 患者で高いという報告が比較的多い²⁾。

2. ADCC 活性

無感作マウスのリンパ球系細胞中に抗腫瘍抗体と協同して腫瘍細胞を傷害する細胞の存在が報告されており, この現象は antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) と呼ばれる。そして抗体と協力して前述の効果を示す細胞群が killer cell と命名されてい

る。ADCC 活性測定では標的細胞に有核培養細胞あるいは赤血球などが用いられるが, 破壊作用機序は標的細胞の相違により異なるとされている⁷⁾。つまり HD 患者における ADCC 活性も使用する標的細胞によって成績が異なることは容易に想像されるところである。今回の検討ではニワトリ赤血球を標的細胞に用いたが, HD 患者の ADCC 活性は健常対照に比して有意に低下していた。In vivo における ADCC の役割についてその全容が解明されているわけではないが, 腫瘍細胞やウイルス感染細胞に対する傷害作用は確かなようである⁸⁾。したがって, 今回の検討で判明した HD 患者の ADCC 活性低下は, HD 患者では発癌率が高いという事実²⁾や HB 肝炎ウイルスキャリアの頻度が高いという事実⁹⁾と関連しているものと思われる。また, ADCC 活性の亢進は腎移植拒絶反応を増強する因子となりうるとされており¹⁰⁾, この反応の低下は移植腎生着率の改善をもたらすかもしれない。実際に HD 患者では移植腎生着率が高いという報告もみられる³⁾。

3. Con A-Ts 機能

サプレッサー T 細胞は免疫応答の場において免疫担当細胞の過剰な反応を抑制し, 免疫反応が適度なものとなるよう調整している。サプレッサー T 細胞機能が低下すると, 免疫応答は過剰になるので自己免疫疾患の発現を容易にする。逆にサプレッサー T 細胞機能が亢進したならば免疫不全状態を招くことになる。HD 患者においてはサプレッサー細胞機能が亢進しているとする報告が多い。しかも mitogen などに対するリンパ球反応の低下はサプレッサー細胞機能の亢進によるものとされている¹⁰⁾。しかし今回の検討では HD 患者の Con A-Ts 機能は健常対照に比して明らかな差を示さなかった。この成績は, サプレッサー T 細胞機能亢進が必ずしも HD 患者における細胞性免疫異常の主要な原因にはならないことを示したといえる。

4. AMLR

AMLR とは自己T細胞が自己 non T細胞膜上に存在する HLA-DR 抗原 (Ia 抗原) を認識して、自己T細胞が分裂、増殖することを示す。HD 患者では、同種異系リンパ球間の反応である mixed lymphocyte reaction の低下を述べた報告¹¹⁾は多いが、AMLR についての報告はいまだ少ない。最近、腎不全患者の AMLR は低下しているという成績¹²⁾が報告された。今回の検討でも、HD 患者の AMLR は低下していた。AMLR の意義は自己認識過程を表わすことにありと考えられている¹³⁾。したがって AMLR の低下は自己認識過程の障害を示唆するものであり、全身性エリテマトーデスやシェーグレン症候群などの自己免疫疾患では AMLR が低下するという報告¹⁴⁾を多くみることでも裏づけられている。つまり HD 患者では自己認識能力が低下しているのであり、自己抗体陽性例の頻度は高いという成績¹⁵⁾と関連があるのかもしれない。さらにインターロイキン 2 などのリンホカインが AMLR で産生されるので¹³⁾、AMLR の低下はリンホカイン産生の低下につながり、間接的に NK 細胞活性や lymphokine activated killer 細胞誘導の低下をもたらすと考えられる。したがって、AMLR の低下は究極的に killer 細胞の抗腫瘍作用の障害を招くことになる。T のみならず T γ や T non γ 細胞に対する AMLR のすべてが低下した今回の成績は、HD 患者においては一部の T 細胞分画のみが傷害されたためではなく、反応細胞である T 細胞全体かあるいは刺激細胞である non T 細胞に対する抑制因子が存在するものと考えられる。しかも後述するように、モノクローナル抗体による T 細胞分画の分析では、AMLR の主な反応細胞群とされている OKT4 および Leu3a の陽性細胞出現率が減少していないので、HD 患者における AMLR の低下は T 細胞分画の減少によるものでないことを示唆する。

5. モノクローナル抗体による末梢血リンパ球サブセットの解析

T 細胞分析：Raska¹⁶⁾の報告によると OKT3、OKT4 および OKT8 陽性細胞の出現率は、尿毒症および HD 患者の両者で健常対照に比して明らかな差を示さなかったという。また、OKT4/8 比が 1 以下を示す症例の出現頻度については、HD 患者は 50 例中 8 例 (16%) であり、健常対照の 133 例中 6 例 (4.5%) に比して高かったという¹⁶⁾。椿ら¹⁷⁾の報告では、HD 患者の OKT3 および OKT4 の陽性細胞出現率は健常対照に比して有意の差を示さなかったが、OKT8 陽性細胞出現率が有意に増加していた。また野田¹⁸⁾は、HD 患者の OKT3 陽性細胞出現率は健常対照に比して増加を示したが、OKT4/8 比は有意の変化を示さなかったという。一方、われわれの成

績では、OKT3、OKT4 および OKT8 陽性細胞出現率が健常対照と HD 患者の間に明らかな相違を示さなかった。つまり、OKT シリーズによる T 細胞サブセット分析は報告者によってすべて異なった結果を示しているといえよう。この原因は対象の年齢、HD 期間あるいは輸血などの背景因子が報告によって異なることによるのかもしれない。

HD 患者の Leu シリーズによる検討については坂口¹⁹⁾はわれわれと同様に HD 患者群では Leu2a 陽性細胞出現率の低下、Leu3a 陽性細胞出現率の増加、Leu4 陽性細胞出現率は有意の変動なしという成績を示している。さらに Leu3a/2a 比は HD 期間が 4 から 8 年の症例では上昇傾向を示したが、8 年以上の症例では逆に低下傾向を示したとしている。他の報告²⁰⁾でも一般に HD 歴の長期化に伴い、Leu3a/2a 比が低下している。われわれの検討では Leu3a/2a 比が上昇していたが、その原因は対象とした HD 患者の HD 期間が平均 5.2 年であり、長期透析例が少なかったことによると考えられる。

NK 細胞分析：NK 細胞の大部分は密度勾配遠心法の large granular lymphocyte (LGL) 分画内に入る。また LGL の大半が OKM1 抗体および Leu7 抗体と反応するとされ、この Leu7 陽性細胞の中でも Leu11a 陽性細胞群は Leu11a 陰性細胞群より強い NK 活性を示すという²¹⁾。今回の検討では HD 患者の OKM1、Leu7、Leu11a 陽性細胞出現率が低下していないので、HD 患者における NK 活性低下は量的なものでなく質的なものと考えられる。

HLA-DR (Ia) 抗原陽性細胞の分析：HLA-DR (Ia) 抗原は B リンパ球、単球、一部の null cell および活性化された T 細胞の細胞膜上に存在し、OKIa1 抗体や HLA-DR 抗体で認識される。今回の検討で認められた HD 患者における OKIa1 抗体および HLA-DR 抗体陽性細胞率の増加は上記のうちのいかなる細胞群の増加によるものか定かでない。

6. 細胞性免疫に対する輸血の影響

輸血による移植腎生着促進作用が Opelz ら²²⁾によって確認されて以来、この点に関する検討が多くなされており、今日では輸血のもつ移植腎生着促進作用は疑いのないものとされている²³⁾。そして生着促進の機序には細胞性免疫の低下が関与するものとされ、輸血による MLR の低下が報告されている²⁴⁾。HD 患者においては貧血に対して輸血が頻に行なわれることから、HD 患者の細胞性免疫については輸血の影響を無視できない。今回の検討における HD 患者の NK 活性、ADCC 活性、Con A-Ts 機能およびリンパ球サブセット分析は輸血の有無によって違いは認められなかった。しかし AMLR

については、輸血歴を有する HD 患者における T と T γ 細胞の反応性が輸血のない患者に比して低下していた。以上まとめてみると、輸血による細胞性免疫の障害は主に自己認識過程にあると考えられる。また、輸血が自己認識過程を混乱させて移植腎生着率を上昇させるものと推測される。

結論

維持透析患者 30 例における細胞性免疫を検討し、以下の結果を得た。

1. 維持透析患者における NK 活性, ADCC 活性および T, T γ , T non γ 細胞の AMLR は健常対照群に比して有意に低下していた。

2. しかし維持透析患者の concanavalin A 誘導サブレッサー T 細胞機能 (Con A-Ts 機能) は健常対照群に比して明らかな差を示さなかった。

3. 維持透析患者の Leu3a, OKM1, Leu11a, OKIa1 および HLA-DR 陽性細胞率は健常対照群に比して有意の増加を, Leu2a 陽性細胞率は有意の減少を示した。

4. 維持透析患者を輸血歴から輸血の既往のない輸血 (一) 群と過去に輸血の既往を有する輸血 (+) 群に分けて検討した。NK 活性, ADCC 活性, Con A-Ts 機能およびリンパ球サブセット解析はいずれも輸血歴の有無によって相違を示さなかった。しかし輸血 (+) 群における T および T γ 細胞の AMLR は輸血 (一) 群に比して有意の低下を示した。

本論文の要旨は第 30 回人工透析研究会総会 (昭和 60 年 7 月, 東京) および第 28 回日本腎臓学会総会 (昭和 60 年 10 月, 東京) で発表した。

文献

- 1) 稲本 元：尿毒症における免疫不全と結核症。透析会誌, 12 : 21-36, 1979
- 2) Sutherland GA, Glass J and Gabriel R : Increased incidence of malignancy in chronic renal failure. *Nephron*, 18 : 182-184, 1977
- 3) Hume DM, Merrill JP, Miller BF and Thorn GW : Experiences with renal homotransplantation in the human : Report of nine cases. *J Clin Invest*, 34 : 327-382, 1955
- 4) Kurz P, Köhler H, Meuer S, Hütteroth T and Meyer zum Büschenfelde KH : Impaired cellular immune responses in chronic renal failure : Evidence for a T cell defect. *Kidney Int*, 29 : 1209-1214, 1986
- 5) Perlmann P and Perlmann H : Contactual lysis of antibody-coated chicken erythrocytes by purified lymphocytes. *Cell Immunol*, 1 : 300-315, 1970
- 6) Badger AM, Bernard DB, Idelson BA and Cooperband, SR : Depressed spontaneous cellular cytotoxicity associated with normal or enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients on chronic haemodialysis. *Clin exp Immunol*, 45 : 568-575, 1981
- 7) 太田善介, 西谷皓次：透析患者における NK, ADCC, 好中球機能, インターフェロン産生能。臨床透析, 2 : 1983-1986, 1986
- 8) 小室勝利：K細胞。日本臨床, 42 (春季臨時増刊号) : 113-121, 1984
- 9) Rashid A, Senger D, McLeish W, Sutherland M, Harris J and Couture R : The effect of host immunity on hepatitis B antigen (HB Ag) infection in hemodialysis patients. *Trans Amer Soc Artif Int Organs*, 21 : 483-487, 1975
- 10) Raskova J and Morrison AB : A decrease in cell-mediated immunity in uremia associated with an increase in activity of suppressor cells. *Am J Pathol* 84 : 1-10, 1976
- 11) Kasakura S and Lowenstein L : The effect of uremic blood on mixed leukocyte reactions and on cultures of leukocytes with phytohemagglutinin. *Transplantation*, 5 : 283-289, 1967
- 12) Frymoyer PA and Davey FR : Defective autologous mixed lymphocyte reactions in patients with renal insufficiency-evidence for cellular and serum factors. *Clin Immunol Immunopathol*, 34 : 189-196, 1985
- 13) 石田康生：II. 免疫応答の機構 2. 自己 MLR—その意義と問題点—。代謝, 20 (臨時増刊号) : 1413-1422, 1983
- 14) 高井正秀, 土肥和紘, 藤井謙裕, 山田宏治, 金内雅夫, 花谷正和, 野中秀郎, 石川兵衛：自己免疫疾患における T 細胞機能：concanavalin A 誘導抑制 T 細胞機能と autologous mixed lymphocyte reaction. 日臨免誌, 7 : 60-67, 1984
- 15) Casciani CU, Simone C, Bonini S, Gallucci MT, Matteucci G, Valesini G, Meli D. and Masala C : Immunological aspects of chronic uremia. *Kidney Int*, 13 (Suppl.) : 49-54, 1978
- 16) Raska K, Raskova J, Shea SM, Frankel RM,

- Wood RH, Lifter J, Ghobrial I, Eisinger RP and Homer L : T cell subsets and cellular immunity in end-stage renal disease. *Am J Med*, 75 : 734-740, 1983
- 17) 椿 和央, 前田裕弘, 数田康仁, 今田聡雄, 入交清博, 堀内 篤 : 長期透析患者のT細胞機能. *日腎誌*, 26 : 389-397, 1984
 - 18) 野田春夫 : 慢性血液透析患者の細胞性免疫能に関する研究. *透析会誌*, 18 : 537-548, 1985
 - 19) 坂口泰弘 : 慢性血液透析患者における細胞性免疫に関する研究 : 第二報 モノクローナル抗体とFACS (fluorescence activated cell sorter) による末梢Tリンパ球サブセットの解析. *奈医誌*, 35 : 369-378, 1984
 - 20) Hamaguchi N, Kobayashi M, Hirabayashi A, Shigemoto K, Usui K, Hayashi K, Yorioka N and Yamakido M : T lymphocyte subpopulations in patients undergoing chronic hemodialysis. *Jap J Nephrol*, 26 : 1205-1212, 1984
 - 21) 安保 徹 : 免疫応答の機構 3. NK 細胞のマーカー—その多様性の理由—. *代謝*, 20 (臨時増刊号) : 1423-1430, 1983
 - 22) Opelz G, Senger DPS, Mickey MR and Terasaki PI : Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants. *Transplant Proc*, 5 : 253-259, 1973
 - 23) Opelz G and Terasaki PI : International Histocompatibility Workshop Study on Renal Transplantation. In "Histocompatibility testing 1980" UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, 592-624, 1980
 - 24) Klatzmann D, Gluckman JC, Foucault C, Duboust A, Bensussan A, Assogba J and Berthelot JM : Modification of mixed lymphocyte reactivity after blood transfusions (BT) in man. *Transplant Proc*, 15 : 1016-1018, 1983