末梢血中好中球の natural cytotoxicity 活性と ADCC 活性

大原守弘・白土雅美・宮田昌之・熊川宏美・佐久間博史・
七宮 実・吉田直衛・吉田 浩・粕川禮司*

Natural cytotoxicity and ADCC activities of peripheral polymorphonuclear-leukocytes Cytotoxic activity of peripheral polymorphonuclear-leukocytes (PMN) of normal subjects and patients with various diseases was tested against K 562 cells for natural cytotoxicity and P 815 cells for ADCC by means of ^{51}Cr -releasing assay incubated for 14 hours. Natural cytotoxicity of PMN of 20 normal subjects was 5.0% at a mean value. Mean values of PMN natural cytotoxicity of patients with asthma, rheumatoid arthritis (RA), chronic hepatitis (CH), malignancy, Behçet's disease and SLE were 10.8%, 4.7%, 1.2%, 1.8% and 1.5% respectively. ADCC activity of normal PMN was 16.0% at a mean value. Mean values of PMN ADCC activity of patients with asthma, RA, CH, malignancy, Behçet's disease and SLE were 2.6%, 4.9%, 35.7%, 15.0%, 24.5% and 34.4% respectively. Natural cytotoxicity of PMN was around 1/6 of that of lymphocytes and ADCC activity of PMN was around 1/2 of that of lymphocytes. However, in all 4 patients with SLE and 2 of patients with Behçet's disease, ADCC activities of their PMN were higher than those of their lymphocytes.

Morihiro Ohara • Masami Shirato • Masayuki Miyata • Hiromi Kumakawa •
Hirofumi Sakuma • Minoru Nanamiya • Naoe Yoshida • Hiroshi Yohida • Reiji Kasukawa*

* The Second Department of Internal Medicine, Fukushima Medical College

リンパ球が示す NK 活性や ADCC 活性はよく知られている。好中球についてのこれらの活性は、表面に Fc レセプターが存在することから、ADCC 活性があることが知られているが¹⁻³⁾、natural cytotoxicity (以下 NC) 活性については不明である。そこで今回膠原病患者の末梢血好中球の ADCC 活性と NC 活性を測定した。あわせて、同一人から得られたリンパ球の両活性を測定し、好中球の値と比較検討した。さらに、好中球の両活性における上清による細胞障害性も検討した。

対象と方法

(1) 対象

対象は福島県立医科大学第二内科で診断された気管支喘息 8 例、慢性関節リウマチ (RA) 17 例、全身性エリテマトーデス (SLE) 4 例、ベーチェット病 7 例、悪性腫瘍 7 例、慢性肝炎 14 例の患者と、健常対照として同内科職員 20 例を用いた。

(2) 好中球とリンパ球の分離

ヘパリン加末梢血より、リンフォプレップ (第一化学) による比重遠沈法により、沈殿層を取り、それを 0.25%

NaCl 液に 2 回混和し、赤血球を溶血させて、好中球を分離した。この好中球は 10% FCS 加 RPMI 1640 にて 2 回洗浄後 $2 \times 10^6/\text{ml}$ に調整して用いた。一方リンパ球は、上記比重遠沈法にて得られた上層の単核球層から、FCS をコートした plastic dish (Falcon, 直径 6 cm) に 37°C 、1 時間反応させて、単球を除去⁴⁾した上清中のリンパ球を 10% FCS 加 RPMI 1640 にて、 $2 \times 10^6/\text{ml}$ に調整して用いた。

(3) natural cytotoxicity 活性あるいは NK 活性の測定

ヒト CML 由来の K 562 (東北大学歯学部 熊谷勝男教授より分与) を標的細胞とした。その 1×10^7 個の細胞に ^{51}Cr 0.1 mCi を加え、 37°C 、1 時間反応後、2 回洗浄し、さらに十分量の培養液中に 37°C 、1 時間反応させ、2 回洗浄後、その 1×10^4 個に 3,000 cpm 以上の放射能活性があることを確認して使用した。エフェクター細胞としては、患者および健常人の好中球ないしリンパ球を用いた。標的細胞の $1 \times 10^4/\text{well}$ とエフェクター細胞の $4 \times 10^5/\text{well}$ 、すなわち E : T 比を 40 : 1 の割合でマイクロプレート (Nunc 社) の孔に入れ、全量を 0.2 ml とし、 37°C 、4~14 時間、5% CO_2 incubator 内で反応させたのち、静かに上清の 0.1 ml を取り、その放射能活性を測定し、以下の式により % cytotoxicity

* 福島県立医科大学第二内科学教室

図1 反応時間と natural cytotoxicity および ADCC 活性

図3 各種疾患患者末梢血好中球の ADCC 活性

を求めた。

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

(4) ADCC 活性の測定

マウスの methylcholanthrene induced mastocytoma 由来の P 815 (東北大学歯学部 熊谷勝男教授より分与) を標的細胞とした。まず K 562 と同様の方法にて、この細胞を ^{51}Cr で標識し、その 1×10^4 個に 3,000 cpm 以上の放射能活性があることを確認し、 $1 \times 10^4/\text{well}$ として使用した。エフェクター細胞として、E:T 比が 20:1 の割合に好中球ないしリンパ球を加え、さらに抗体とし

図2 各種疾患患者末梢血好中球の natural cytotoxicity 活性

て抗 P 815 ウサギ抗血清の 10^{-4} 希釈非働化血清を加え、 37°C 、4~14 時間、5% CO_2 incubator で反応させたのち、その上清の 0.1 ml を取り、放射能活性を測定し、NK と同様にして % cytotoxicity を求めた。この場合の spontaneous release は、エフェクター細胞のみ加え、抗体を加えないものの値とした。リンパ球の NK および ADCC 活性の反応時間は 4 時間のみを用いた。

(5) natural cytotoxicity および ADCC 培養上清による cytotoxicity の測定

^{51}Cr を標識しない K 562 細胞と好中球またはリンパ球を混合し、 37°C で好中球は 14 時間、リンパ球は 4 時間反応させたのち、その培養上清を取った。

また ^{51}Cr を標識しない P 815 細胞に好中球またはリンパ球を混合し、さらに上記 ADCC と同様の抗体を加え、 37°C で好中球は 14 時間、リンパ球は 4 時間反応させたのち、その培養上清を取った。この両上清を ^{51}Cr をラベルした K 562 と P 815 の標的細胞に加え、 37°C 、4 時間反応後に、cytotoxicity を前記方法と同様に測定した。

成績

① 好中球の cytotoxicity 活性の反応時間による相違は、図 1 のごとく NC 活性は 4 時間から 14 時間と反応時間が長くなるにしたがい 8 例中 5 例で活性が上昇した。また ADCC 活性でも、4 および 6 時間より 14 時間の反応で 9 例中 7 例に活性の上昇が認められた。そこで好中球における両活性の反応時間は 14 時間で行った。

② 好中球の NK 活性は、図 2 のごとく、個人によりかなりバラつきがあった。健康人 20 例の平均は 5.0% で

図4 末梢血リンパ球 (Lym) の NK 活性と好中球 (PMN) の NC 活性の比較

図5 末梢血リンパ球 (Lym) と好中球 (PMN) の ADCC 活性の比較

あり、気管支喘息8例の平均は10.8%と健常人の値より高値であった。RA 17例の平均は4.7%、慢性肝炎14例の平均は3.8%と、健常人の値と比較して差を認められなかった。一方、悪性腫瘍患者17例の平均は1.2%、ベーチェット病7例の平均は1.8%、SLE 4例の平均は1.5%と、3疾患では健常人の値より低値であった。

③ 好中球の ADCC 活性は、図3のごとく、NC 活性よりさらに大きいバラつきを示した。

健常人25例の平均値は16.0%であり、気管支喘息での平均値は2.6%、RA での平均値は4.9%と、ともに低値を示した。悪性腫瘍患者での平均値は15%と健常人の値と差が認められなかった。一方、慢性肝炎での平均値は35.7%、SLE での平均値は34.4%、ベーチェット病での平均値は24.5%と、3疾患では高値であった。

④ 膠原病患者につき、末梢血のリンパ球が示す NK 活性と好中球が示す NC 活性とを同時に測定し、比較検討した。健常人、RA、ベーチェット病および SLE 患者のリンパ球が示す NK 活性は好中球の NC 活性の値に比してきわめて高値であり、図4のごとく、SLE の1例を除いて、いずれもリンパ球の値が好中球の値より高値であった。

⑤ 膠原病患者につき、末梢血のリンパ球と好中球が示す ADCC 活性を比較すると、図5のごとく、健常人と RA 患者では全例においてリンパ球の活性が好中球の

値より高値であったが、SLE 患者の4例では全例が好中球の活性がリンパ球の値より高値であり、またベーチェット病患者6例中2例において、好中球の活性がリンパ球の値より高値であった。好中球の ADCC 活性がリンパ球の値より高値を示した SLE 4例とベーチェット病2例の計6例のリンパ球の ADCC 活性は、ほかのいずれのリンパ球の ADCC 活性より低値を示した。

⑥ リンパ球と好中球の K 562 混合培養上清が示す細胞障害性を図6aに示した。リンパ球の上清は K 562 細胞に対して障害性を示したが、P 815 細胞には障害性を示さなかった。一方、好中球の上清は低値ながらも K 562 細胞にも P 815 細胞にも障害性を示した(図6b)。K 562 細胞の場合と同様にリンパ球の上清は K 562 細胞に障害性を示したが、P 815 細胞には障害性を示さなかった。好中球の上清は両細胞に障害性を示したが、K 562 細胞に対してより強かった。

考 察

SLE 患者末梢血リンパ球の NK 活性および ADCC 活性が低下していることはよく知られている⁵⁻¹⁰⁾。リンパ球が示す細胞障害試験は広く行われているが、好中球に関する成績は少ない。好中球は本来貪食作用をもつ細胞であるが、貪食後に放出する蛋白分解酵素や活性酸素が細胞障害性を示すことが知られている。

図 6 末梢血リンパ球と好中球(PMN)のK562との混合培養上清(a)とP815 ADCC 培養上清(b)によるK562, P815細胞への障害性

NC 活性は14時間と長い反応時間をとることにより弱いながら活性が認められたが、リンパ球のNK活性に比しきわめて低く、健常人ではリンパ球活性の約1/6であった。膠原病、癌、慢性肝炎患者では健常人の活性とほぼ同じか、低値であったが、気管支喘息患者で高値例が認められた。気管支喘息患者好中球のNC活性が高値である原因は不明であるが、気管支喘息に感染に関係して誘発される感染型喘息があることを考え合わせて今後検討されるべき課題である。

好中球のADCC活性は、14時間と反応時間を延長すると強い活性を示し、リンパ球のADCC活性と比較すると、健常人で約1/2の活性であった。好中球のこの活性はNC活性より、はるかに強いものであった。気管支喘息とRA患者でのADCC活性が健常人より低く、ベーチェット病、SLEおよび慢性肝炎で高い活性が認められたが、理由に明らかではない。SLE 4例全例において、好中球のADCC活性値が、リンパ球の値より高値を示し、またベーチェット病の6例中2例で同様に好中球の値がリンパ球の値より高値を示した。しかも、好中球のADCC活性がリンパ球の活性より高値を示した6例全例において、リンパ球のADCC活性がきわめて低値であることが認められた。この現象から、リンパ球のADCC活性低下を好中球が補うかのごとく高値を示

したことが推察された。このような現象が慢性肝炎患者においても認められたことを別に報告¹¹⁾した。

好中球の細胞障害活性に関しては、その細胞表面にFcレセプターが存在することから、ADCC活性があることがGale¹⁾、Clark²⁾、Dvorak³⁾により癌細胞を標的細胞として報告されている。Zighebiom¹²⁾は好中球の標的細胞への結合が好中球表面に存在するFcレセプターによることを報告している。

好中球のK562およびP815細胞との混合培養上清は、リンパ球の培養上清と異なり、K562とP815の細胞の種類に関係なく、ほぼ同じ程度に障害性を示した。この点が、リンパ球の培養上清がK562細胞にのみ強い障害性を示したことと異なる点である。Hafeman¹³⁾は、好中球が示すADCCによる細胞破壊機序には好中球から出る O_2^- 、 H_2O_2 、 1O_2 、 $\cdot OH$ などの活性酸素が大いに関係すると述べている。リンパ球は、このような活性酸素を放出しないので、好中球とリンパ球が示す標的細胞障害性の機序は、このような活性酸素放出の有無によっても異なるものと考えられる。さらに、PHAなどのmitogenで好中球を刺激すると、リンパ球と同様に細胞障害活性が出現するという報告^{14,15)}もあることから、好中球にはリンパ球と類似した性質が存在することも考えられている。

結 論

末梢血好中球にも、リンパ球と同様に、標的細胞に対し、弱いながらNC活性と強いADCC活性が存在することが認められた。

NC活性は低く、健常人でリンパ球が示す活性の約1/6であり、気管支喘息患者でやや高値が認められた。

好中球のADCC活性は健常人で、リンパ球が示す値の約1/2であり、SLE、ベーチェット病および慢性肝炎患者で高値が認められた。

SLE患者4例の全例とベーチェット病患者6例中の2例で好中球のADCC活性がリンパ球の活性より高値を示し、この6例全例のリンパ球のADCC活性はきわめて低値であった。

リンパ球のK562およびP815細胞との混合培養はK562細胞に対し強い障害性を示したが、P815細胞に対しては障害性を示さなかった。

好中球のK562およびP815細胞との混合培養上清はK562とP815の両細胞に対しほぼ同程度の障害性を示した。

文 献

- 1) Gale, R. P., Zighebiom, J.: Polymorphonuclear leukocytes in antibody-dependent cellular cytotoxicity. J. Immunol. 114: 1047-1051, 1975.
- 2) Clark, R. A., Klebanoff, S. I.: Studies on the

- mechanism of antibody-dependent polymorphonuclear leukocytes-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 119: 1413-1418, 1977.
- 3) Dvorak, A.M., Connell, A.B., Proppe, K., Dvorak, H.F.: Immunologic rejection of mammary adenocarcinoma (TA3-ST) in C57BL/6 mice. Participation of neutrophilic and activated macrophages with fibrin formation. *J. Immunol.* 120: 1240-1248, 1978.
- 4) 熊谷勝男, 伊東恭悟, 多田正人, 日沼州司: 再度, マクロファージの純粋分離法に関して. *医学のあゆみ* 110: 611-615, 1979.
- 5) Feldmann, J. L., Becker, M. J., Moutsopoulos, H.: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in selected autoimmune disease. *J. Clin. Inv.* 58: 173-179, 1976.
- 6) Jouanen, E.D., Bankurst, A.D., Williams, R.C.: Antibody-mediated lymphocytotoxicity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arth. Rheum.* 19: 133-141, 1976.
- 7) Schneider, J., Clin. N., Frious, G.: Reduced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 20: 187-192, 1975.
- 8) Santol, D., Koprowski, H.: Mechanisms of activation of human natural killer cells against tumor and virus-infected cells. *Immunol. Rev.* 44: 125-163, 1979.
- 9) Hoffman, T.: Natural killer function in systemic lupus erythematosus. *Arth. Rheum.* 23: 30-35, 1980.
- 10) 権田信之, 押味和夫: SLEにおけるNatural Killer細胞活性と抑制因子. *臨床免疫* 12: 674-684, 1980.
- 11) 大原守弘, 五十嵐哲, 小橋主税, 白土雅美, 宮田昌之, 佐久間博史, 七宮 実, 吉田 浩, 粕川禮司: 癌患者末梢血好中球のNKおよびADCC活性. *消化器と免疫* No. 8, 1982, p 234-237.
- 12) Zighelboim, J., Gale, R. P., Kedar, E.: Polymorphonuclear leukocyte Fc receptors in antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). *Transplantation* 21: 524-526, 1976.
- 13) Hafeman, D. G., Lucas, Z. J.: Polymorphonuclear leukocyte-mediated, antibody-dependent, cellular cytotoxicity against tumor cells: Dependence on oxygen and respiratory burst. *J. Immunol.* 123: 55-62, 1979.
- 14) Nelson, D. L., Bundy, B. M., Pitchon, H. E., Blaese, R. M., Stroder, W.: The effector cells in human peripheral blood mediating mitogen-induced cellular cytotoxicity. *J. Immunol.* 117: 1472-1480, 1976.
- 15) Simchowitz, L., Schur, P. H.: Lectin-dependent neutrophil-mediated cytotoxicity 1. Characteristics. *Immunol.* 31: 303-311, 1976.