

原 著

肺結核症におけるNK細胞活性の検討

米田尚弘・石橋純子

西川 潔・三上 理一郎

奈良県立医科大学第2内科

葛西正孝・徳永 徹

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和56年10月5日

NK CELL ACTIVITY IN PULMONARY TUBERCULOSIS

Takahiro YONEDA*, Junko ISHIBASHI, Kiyoshi NISHIKAWA, Riichiro MIKAMI,
Masataka KASAI and Tohru TOKUNAGA

(Received for publication October 5, 1981)

NK cell activity, which may provide defense mechanism in the immunosurveillance system, was studied in 38 patients with active pulmonary tuberculosis and 54 sex, age-matched healthy controls.

The results were as follows:

- 1) The mean NK cell activity in patients with active pulmonary tuberculosis ($58.7 \pm 26.4\%$) was significantly higher ($p < 0.001$) than that in normal controls ($17.4 \pm 12.2\%$).
- 2) The mean NK cell activity in normal controls over 60 years of age ($11.2 \pm 9.6\%$) was significantly lower ($p < 0.001$) than that in those under 60 years of age ($22.3 \pm 11.8\%$).
- 3) The mean NK cell activity in patients who converted to negative tubercle bacilli by anti-tuberculous drugs ($71.9 \pm 35.9\%$) was significantly higher ($p < 0.05$) than that in newly diagnosed patients ($43.2 \pm 20.7\%$).
- 4) The mean NK cell activity in patients who continued excreting tubercle bacilli with resistance to any drugs (so-called "Chronics") was $59.4 \pm 30.3\%$.

緒 言

肺結核症においては、T細胞とマクロファージによって担われた細胞性免疫 (cell-mediated immunity) が感染防御の主体であることが知られている^{1,2)}。ツベルクリン反応は、このような結核感染防御免疫の指標として、もつとも広く用いられている。しかし、このような遅延型アレルギー反応が、実際に感染防御免疫機構の主役であるかどうかについては、多くの研究にかかわらず、なお一部に異論もある³⁾。

一方、T細胞のサブポピュレーションに関する研究は、最近著しく進歩したが、肺結核症における感染防御を担うT細胞と、遅延型アレルギー反応を担うT細胞の異同も、現在明確にされていない⁴⁾。

最近、広義の細胞性免疫 (cellular immunity) のエフェクター細胞として、T細胞、マクロファージのほかに、ナチュラルキラー (natural killer; NK) 細胞の存在が報告され、ウイルス感染⁵⁻⁷⁾や腫瘍に対する初期防御機構の一翼を担う細胞として重要視されるようになった。しかし、細菌感染とNK細胞活性について、報告はほと

* From the 2nd Department of Internal Medicine, Nara Medical University, 840, Shijo, Kashihara-shi, Nara 630 Japan.

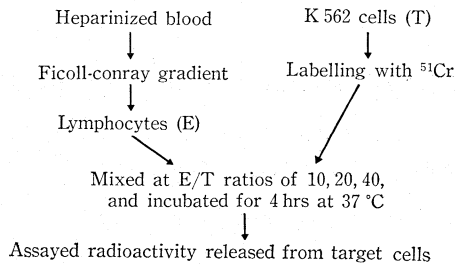
Table 1. Study Subjects

Group	No. of subjects	Age (yrs.)		Sex	
		Mean	Range	Male	Female
Normal control	54	59	21—88	29	25
Tuberculosis	38	60	23—84	23	15
Newly diagnosed*	15	52	23—78	10	5
Advanced, intractable**	13	64	39—81	7	6
Treated***	11	65	37—84	6	5

* Patients diagnosed for the first time by chest roentgenogram and positive tubercle bacilli on sputum smear or culture.

** Patients who continued excreting tubercle bacilli with resistance to any drugs (so-called 'Chronics').

*** Patients whose sputums were negative for tubercle bacilli after treatment.



$$\text{NK activity} = \frac{\text{test release (cpm)} - \text{spontaneous release (cpm)}}{\text{maximum release (cpm)} - \text{spontaneous release (cpm)}} \times 100$$

Fig. 1. Method for NK assay.

んどない。今回、我々は肺結核症患者におけるNK細胞活性の動態を検討したので報告する。

対象および方法

1. 患者群およびコントロール群 (Table 1) : 当科および関連病院入院中の活動性肺結核症患者38名 (男子23名, 女子15名, 平均年齢60歳) を対象とした。内訳は以下の通りである。I群: 初回治療例15例—入院時に喀痰の塗抹または培養で結核菌を検出し, 初回治療を行なった例で, NK細胞活性の測定は治療開始前に行なつた。II群: 排菌陰性化例11例—抗結核剤治療により排菌が陰性化した症例で, 治療開始後平均3ヵ月で測定した。III群: 慢性難治例13例—薬剤耐性結核菌を1年以上排菌している症例。コントロール群としては, 患者群と年齢 (患者群年齢±2年) および性をマッチさせた健康人54名 (男子29名, 女子25名, 平均年齢59歳) を対象とした。

2. NK細胞活性の測定方法: その概要を Fig. 1 に示した。すなわちヘパリン化末梢血から比重遠心法にてリンパ球を分離し, エフェクター細胞 (E) とした。またヒトの CML 由来の培養株 K562 を ^{51}Cr で標識して標的細胞 (T) とした。E/T 比を 10, 20, 40 にして 5% CO_2 インキュベーター内で 37°C 4時間混合培養後遠心

し, 上清中の遊離 ^{51}Cr 量をガンマカウンターにて測定した。% specific ^{51}Cr release を以下の式に従つて算出し, NK細胞活性とした。

$$\% \text{ specific } ^{51}\text{Cr} \text{ release} = \left[\frac{\text{experimental } ^{51}\text{Cr} \text{ release (cpm)} - \text{spontaneous } ^{51}\text{Cr} \text{ release (cpm)}}{\text{maximum } ^{51}\text{Cr} \text{ release (cpm)} - \text{spontaneous } ^{51}\text{Cr} \text{ release (cpm)}} \right] \times 100$$

spontaneous ^{51}Cr release は, 標的細胞のみ培養した際の遊離 ^{51}Cr 量より算出し, maximum ^{51}Cr release は, 標的細胞に 1N HCl を加えた際の遊離 ^{51}Cr 量より算出した。測定は各 E/T 比において triplicate で行ない平均した。

結果

1. 健康人のNK細胞活性: 健康人54名のNK細胞活性の平均値は, E/T比=10において $9.1 \pm 3.03\%$, E/T比=20において $17.4 \pm 12.2\%$, E/T比=40において $26.9 \pm 7.98\%$ であつた。同一人について測定時期による変動は軽微であり, 性差は認められなかつた。年齢による影響に関しては, 60歳以上で, 60歳未満に比べて有意に低下していた ($p < 0.001$) (Table 2)。

2. 肺結核症患者のNK細胞活性: 活動性肺結核症患

Table 2. NK Activity of Healthy Controls

Age (yrs.)	NK activity (%)*
Total	17.4 ± 12.2 (n=54)
20' S	26.3 ± 1.5 (n= 4)
30' S	19.2 ± 4.3 (n= 6)
40' S	16.8 ± 8.8 (n= 6)
50' S	27.1 ± 14.9 (n=12)
} 23.2 ± 11.8 (n=28)	
60' S	7.0 ± 4.1 (n= 5)
70' S	11.9 ± 10.9 (n=13)
80' S	11.9 ± 10.5 (n= 8)
} 11.2 ± 9.6 (n=26)**	

* Mean ± S.E. : E/T ratio = 20.

** p < 0.001

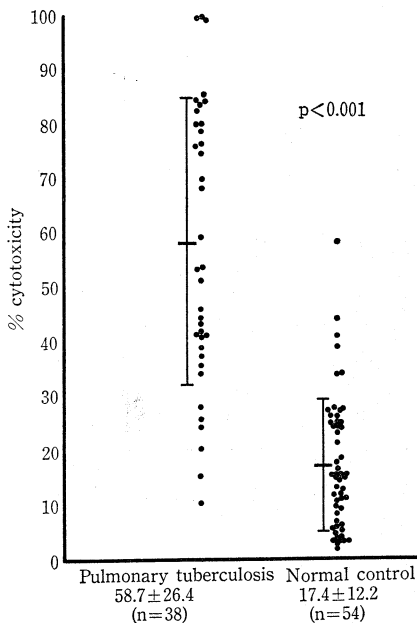


Fig. 2. NK cell activity in patients with pulmonary tuberculosis and normal controls.

者38名のNK細胞活性の平均値は、E/T比=20において58.7±26.4%であり、健常人に比べて著明に上昇していた(p<0.001)(Fig. 2)。一方、NK細胞活性の上昇していない症例が数例認められた。

次に肺結核症の病態により、NK細胞活性の変動をみた(Fig. 3)。初回治療例15例のNK細胞活性の平均値は43.2±20.7%、治療による排菌陰性化例11例のNK細胞活性の平均値は71.9±25.9%であつて、両者間に有意差を認めた(p<0.05)。慢性難治例15例のNK細胞活性の平均値は59.4±30.3%であり、初回治療例に比べて高く、排菌陰性化例に比べて低い値を示した。

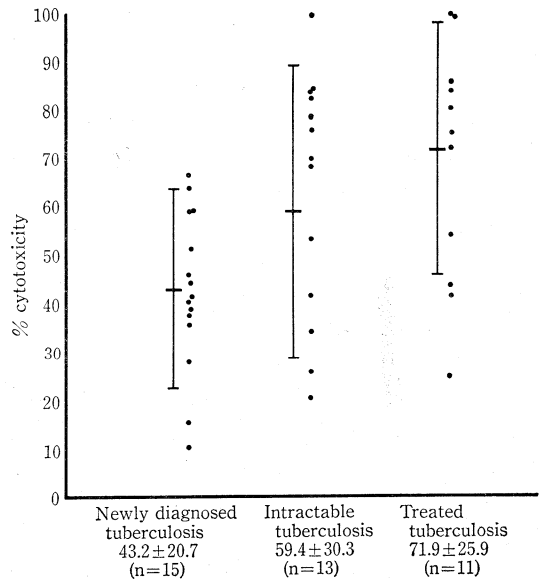


Fig. 3. Fluctuation of NK cell activity in patients with pulmonary tuberculosis at 3 different stages which were classified according to the state of excretion of tubercle bacilli.

考 察

NK細胞は、1973年に Takasugi ら⁸⁾によつて報告され、未感作リンパ球がある種の腫瘍細胞に対して *in vitro* で細胞障害性をもつことが示された。以来、NK細胞は腫瘍⁹⁾やウイルス感染¹⁰⁾に対する免疫監視機構を担う細胞として注目されている。しかし、慢性細菌感染症におけるNK細胞活性に関する研究はほとんどみられず、肺結核症におけるNK細胞活性の検索は、我々の報告が最初であると思われる。

我々の健常人における観察では、60歳以上においては60歳未満に比べてNK細胞活性が有意に低下しており、老化によりNK細胞活性が影響を受けることが示された。この点は、大森¹¹⁾の成績と一致している。またNK細胞活性に性差は認めなかつた。一方、患者群と、年齢、性をマッチさせたコントロール群とのNK細胞活性を比較検討したところ、活動性肺結核症患者38名中31名において、健常人に比べて、NK細胞活性の著明な上昇が認められた。

肺結核症において、NK細胞活性が健常人に比べて高値を示した理由としては、種々の可能性が考えられる。第1は肺結核症患者において、NK細胞の数が健常人に比べて増加している可能性である。しかし、この点については、特有なマーカーをもたないNK細胞を純粋に分離することが現在不可能であり、したがつてNK細胞の数を算定することも困難である。ヒトのNK細胞は、(1)非附着性、(2)非貪食性、(3)表面免疫グロブリン陰性、(4)ヒ

ツジ赤血球とロゼットを形成しない (Non-ERFC), (5) 補体レセプターを保有しない, (6) IgG の Fc 部分に対するレセプターを保有する (IgG FcR⁺) 特性を有するリンパ球であるという報告¹²⁾が多い。ただし, NK 細胞がヒツジ赤血球とロゼットを形成するかどうかについては, 議論が分かれている。West ら¹³⁾, Santoli ら¹⁴⁾は IgG FcR⁺ の低親和性 ERFC (E rosette forming cell), すなわち T γ 細胞が NK 細胞活性を有することを報告している。一方, 岳中ら¹⁵⁾は肺結核症患者において, T γ 細胞が健康人に比べて増加していることを報告している。したがって, NK 細胞の一部が T γ 細胞とオーバーラップしていると仮定すれば, 肺結核症患者において, NK 細胞数が増加している可能性は考えられる。この点に関して, 我々は NK 細胞に対するモノクローナル抗体 OKM1¹⁶⁾ を用いて, NK 細胞の数と, 活性の関係を現在検討中である。

第2の可能性は, nonfunctional な NK 前駆細胞が functional な, いわば「活性化」した NK 細胞に分化し, NK 細胞活性が上昇している可能性である。現在, この NK 細胞活性化にかかわる細胞や, その機序は完全には明らかでないが, インターフェロン (IFN と略す) とマクロファージが, 重要な役割を果たしていると考えられる。ヒトの IFN によるヒト NK 細胞活性増強効果は, Trinchieri ら¹⁷⁾によりはじめて明確に示された。彼はヒトの末梢血を一連の腫瘍細胞やウイルス感染細胞と混合培養し, 培養上清中に IFN が産生されること, および IFN が NK 細胞活性を上昇させることを報告した。続いて Djcu ら¹⁸⁾は, マウスの IFN が *in vivo*, *in vitro* でマウス NK 細胞活性を増強することを報告した。今回報告した肺結核症患者における NK 細胞活性上昇機序についても IFN が関与している可能性が推測される。事実, 長野ら¹⁹⁾は BCG 感染マウスにおいて, type I IFN の一過性の上昇を観察しているが, NK 細胞活性は測定していない。肺結核症患者において IFN 活性を測定した報告は, 現在のところみられないが, 肺結核症患者においても IFN 活性が上昇している可能性は予測される。従来, 結核免疫の成立, 発現により, 感作 T 細胞がマクロファージを介して抗原と結合し, 種々のリンフォカインが産生, 放出され, その結果, 感染局所にマクロファージを集積せしめ, マクロファージを活性化することによつて, 結核菌の増殖抑制が行なわれると考えられ¹²⁰⁾ている。このような結核免疫の発現過程で放出されるリンフォカインの中には, type II IFN が含まれていることが, Youngner ら²¹⁾による動物実験によつて報告されている。したがって, 結核菌感染による type I IFN の上昇, および結核免疫の発現過程における type II IFN の産生が考えられる。

次に, NK 細胞活性増強におけるマクロファージの関

与については, Tracey ら²²⁾が BCG 感染マウスを用いて証明している。すなわち彼は, BCG の抗腫瘍活性を解析する目的で, 10⁸ 個の BCG 生菌をマウス腹腔内に接種し, peritoneal exsudate cell (PEC) 中に, 接種後 3~4 日をピークとした NK 細胞活性の著明な上昇を認めるが, 3 週間後には投与前のレベルにもどることを報告した。さらに彼は, BCG 感染マウスの PEC 中の活性化マクロファージを正常マウスに移入することにより, 正常マウスにおいても NK 細胞活性が増強されることを示した。この実験は, 活性化マクロファージが BCG の NK 細胞活性化において重要な役割を果たしていることを示したものである。肺結核症患者においても, 種々の方法により, マクロファージが活性化されていることが報告されており, マクロファージ活性化と NK 細胞活性上昇との関連性が推測される。

今回の成績では, 肺結核症患者の病態により, NK 細胞活性の変動がみられた。すなわち抗結核剤治療により排菌が陰性化した症例群では, 排菌陰性時の活動性結核群に比べて NK 細胞活性が有意に高かった。また慢性難治例が, 初回治療例に比べて NK 細胞活性が高い傾向にあるが, 統計学的に有意差を認めなかつた。抗結核剤治療による排菌陰性化に伴う NK 細胞活性の上昇は, 抗結核剤の影響か, あるいは排菌陰性化の背景にある何らかの細胞性免疫の変化によるのかは明らかでない。この成績が, 肺結核症の治癒経過となんらかの関連があるかどうかは解明されるべき問題であるが, その点に関しては, さらに治療による臨床的改善に伴う NK 細胞活性の経時的変化を, 検討する必要がある。また難治症例の免疫学的背景に関する研究は極めて少ないが, 上述のように, 岳中らは, IgG FcR⁺ T 細胞 (T γ) の増加を報告しており, この事実が NK 細胞活性の上昇傾向と関連がある可能性がある。

肺結核症における NK 細胞活性に関する研究がいまだ初期の段階にあり, 今回は現象の記載にとどめざるをえなかつたが, 今後の発展により, NK 細胞活性上昇の機序も, より一層明らかになるであろう。

結 語

生体の初期防御機構を担っている NK 細胞活性を, 肺結核症患者において検討した。活動性肺結核症患者 38 名 (初回治療例 15 例, 排菌陰性化例 11 例, 慢性難治例 13 例) および患者群と年齢, 性をマッチさせた健康人 54 名を対象として, K562 に対する NK 細胞活性を, ⁵¹Cr 遊離法を用いて測定し, 以下の結果を得た。

- 1) 活動性肺結核症患者末梢血の NK 細胞活性は 58.7 ± 26.4% で, 健康人の NK 細胞活性 (17.4 ± 12.2%) に比べて, 著明に高値を示した ($p < 0.001$)。
- 2) 初回治療例の NK 細胞活性は 43.2 ± 20.7%, 排

菌陰性化例は $71.9 \pm 25.6\%$ であり、排菌陰性化に伴いNK細胞活性が有意 ($p < 0.05$) に上昇した。また慢性難治例のそれは $59.4 \pm 30.3\%$ であつた。

肺結核症患者におけるNK細胞活性の上昇の機序につき、種々考察を加えたが、NK細胞を、結核症における細胞性免疫の中に、位置づけうると考える。

本論文の要旨は、第56回日本結核病学会総会で発表した。

文 献

- 1) Mackaness, G.B.: Resistance to intracellular infection, *J Inf Dis*, 123: 439, 1971.
- 2) Mackaness, G.B.: The immunology of antituberculous immunity, *Amer Rev Resp Dis*, 97: 337, 1968.
- 3) Youmans, G.P.: Relationship between delayed hypersensitivity and immunity in tuberculosis, *Amer Rev Resp Dis*, 111: 109, 1975.
- 4) Patel, P.J. and Lefford, M.J.: Antigen specific lymphocyte transformation, delayed hypersensitivity and protective immunity, *Cell Immunol*, 37: 315, 1978.
- 5) Kiessling, R. et al.: "Natural killer" cells in the mouse, *Eur J Immunol*, 5: 112, 1975.
- 6) Santoli, D. and Koprowski, H.: Mechanism of human natural killer cells against tumor and virus-infected cells, *Immunological Rev*, 44: 125, 1979.
- 7) Kärre, K. et al.: Low natural in vivo resistance to syngeneic leukemias in natural killer-deficient mice, *Nature*, 284: 624, 1980.
- 8) Takasugi, M. et al.: Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells, *Cancer Research*, 33: 2898, 1973.
- 9) Kasai, M. et al.: In vivo effect of anti-sialo GM₁ antibody on natural killer activity, *Nature*, 291: 334, 1981.
- 10) Welsh, R.M.: Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice, *J Exp Med*, 148: 163, 1978.
- 11) 大森景文: ヒトの Natural killer cell, 感染・炎症・免疫, 9: 168, 1979.
- 12) Cooper, S.M. et al.: Spontaneous cell-mediated cytotoxicity against Chang cells by nonadherent, non-thymus-derived, Fc receptor bearing lymphocytes, *Cell Immunol*, 32: 135, 1977.
- 13) West, W.H. et al.: Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell lines, *J Immunol*, 118: 355, 1977.
- 14) Santoli, D. et al.: Spontaneous cell-mediated cytotoxicity in humans, *Clin Exp Immunol*, 33: 309, 1978.
- 15) 岳中耐夫: 難治性肺結核症患者における免疫学的背景に関する研究, 結核, 56: 275, 1981.
- 16) Zarling, J.M. and Kung, P.C.: Monoclonal antibodies which distinguish between NK cells and cytotoxic T lymphocytes, *Nature*, 288: 394, 1980.
- 17) Trincheri, G. et al.: Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells, *J Exp Med*, 147: 1314, 1978.
- 18) Djeu, J.Y. et al.: Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers, *J Immunol*, 122: 175, 1979.
- 19) Nagano, Y. et al.: Induction of virus inhibitory factor or interferon by cell fractions of *Mycobacterium tuberculosis*, *Japan J Microbiol*, 15: 542, 1971.
- 20) 徳永 徹: マクロファージの活性化と分化, 結核, 11: 503, 1980.
- 21) Youngner, J.S. and Salvin, S.B.: Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity, *J Immunol*, 111: 1914, 1973.
- 22) Tracey, D.E. et al.: BCG-induced effector cells, *J Immunol*, 119: 1145, 1977.