

術中輸血のNK活性ならびにリンパ球 幼若化反応に及ぼす影響

千葉大学第1外科

石神 博昭 藤本 茂 橘川 征夫
宮崎 勝 雨宮 邦彦 大山 欣昭
呉 正信 遠藤 文夫 R.D. セレスタ
志村 賢範 高橋 修 奥井 勝二

THE EFFECT BLOOD TRANSFUSION ON NATURAL KILLER ACTIVITY AND MITOGEN INDUCED LYMPHOPROLIFERATION

Hiroaki ISHIGAMI, Shigeru FUJIMOTO, Yukio KITSUKAWA, Masaru MIYAZAKI
Kunihiko AMEMIYA, Masanobu KURE, Nobuaki OHYAMA, Fumio ENDO
R.D. SHRESTHA, Takanori SHIMURA, Osamu TAKAHASHI and Katsuji OKUI
The 1st Department of Surgery, Chiba University, School of Medicine

消化器癌症例16例の術中および術直後における輸血がNatural killer 活性(NK活性)およびリンパ球幼若化反応にどのような影響を与えるかを調べた。上記の患者より末梢血をヘパリン採血し、これよりリンパ球を分離し、NK活性の測定、PHA-LP反応およびConA-LP反応を行った。輸血施行群8例(1925±1707ml)の術後3週におけるNK活性値は術前値に比べ有意高値を示した。一方、輸血未施行群8例の術後2日におけるNK活性値は術前値に比べ有意低値を示した。

また、輸血施行群と未施行群の術前後の各時期におけるNK活性値の間では術前で輸血未施行群が有意高値を示したが、その他の各時期では有意差は見られなかった。輸血施行群のPHA-LP反応は術後1週、2週および3週において術前値に比べ有意低下を見た。輸血未施行群では術後2週および3週において術前値に比べ有意低下が見られた。つぎに、輸血の有無による比較では、輸血未施行群が術後1週においてのみ有意高値を示した。ConA-LP反応でもほぼ同様の傾向が見られた。NK活性とPHA-LPおよびConA-LP反応との間には術前後を通じて有意な相関は見られなかった。一方、PHA-LPとConA-LP反応間には輸血施行群、未施行群とも術前後を通じ有意相関が見られた。

以上から考えて、NK活性、リンパ球幼若化反応は術後の諸因子、とくに大量輸血により大きな影響を受けると考えられるため、担癌体術後の免疫能評価にはこの事実を充分考慮に入れる必要があると思われた。

索引用語：ナチュラルキラー活性、リンパ球幼若化反応

緒 言

正常未感作リンパ球がある種の腫瘍細胞をin vitroにおいて障害するという現象が1973年に報告されて以来、natural cell-mediated cytotoxicityならびにそれを担当する細胞であるnatural killer cell(以下NK細胞)がにわかに注目されるようになった。

一方、最近では麻酔、術前後管理の進歩などによりかなり侵襲の大きな手術も安全になされ得るようになってきており、これに伴ない術前ならびに術中・術後に大量の血液製剤の投与が行われている。

観点を変えるなら、血液製剤、とくに輸血量の多少が手術侵襲と関連するという考え方と大量輸血の場合

は、赤血球とともにリンパ球の移入も大量に行われるため、Tリンパ球の細胞表面上に分布している複数の供血者の組織適応抗原であるHLA-A, HLA-B, HLA-C, リンパ球混合反応決定基も移入され、一種の臓器移植—通常の臓器移植とは異なり複数の異なった組織適応抗原が移植される—という見方をすることも出来る。以上の理由より輸血の宿主免疫能に及ぼす影響は、癌免疫療法が術後一般的に行われている現在宿主の免疫能をより正確に評価することは必要かつ有意義なことと考えられる。

著者らは17例の消化器癌患者の手術前後におけるNK活性を測定すると同時に、術中または術直後に輸血を施行した症例と全く輸血を施行しなかった症例の間での検討を加えらるとともに、同一症例末梢血リンパ球のphytohemagglutinin (以下PHA) およびconcanavalin A (以下ConA) による幼若化反応(lymphoproliferative-LP 反応)を測定し、NK活性を含めたこれら三者間の相関に関して検討を加えた。

対象および方法

対象は胃癌7例、大腸癌3例、肝胆道癌2例、その他の癌5例の計17例であり、これらの症例に関して術前、術後2日、1週、2週、3週にそれぞれNK活性を測定すると同時にPHA-LP反応、ConA-LP反応をも測定した。なお、これらの症例は術前および術後3週までは抗癌剤、免疫賦活剤は使用していない。

NK活性の測定は末梢血をヘパリン採血し、KAC(日本抗体研究所) 貪食法による単球・マクロファージの除去を行った後、Ficoll-Conray法によりリンパ球を分離し、この 2×10^6 /wellをeffector細胞とし、LinbroあるいはFalconのmicrotest t plate (flat-bottom)に注入した。標的細胞はヒト赤白血病由来の細胞であるK562を用い、 $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ で標識した後、充分洗滌し、 4×10^3 /wellに調整し CO_2 incubator(5% CO_2 in air)内で両者を12時間培養後放出された ^{51}Cr の放射活性をLKB wallac 1280 Ultragammaにより測定し、NK活性を $(\text{E-S}/\text{M-S}) \times 100$ で算出した。なお、Eはexperimental ^{51}Cr release, Sはspontaneous ^{51}Cr release, Mは標的細胞を10%サポニン溶液で処理して得られた値であるmaximal ^{51}Cr releaseを示す。また、測定はすべて5 wellを並行して行った。

LP反応は上記と同様の方法で得られたリンパ球(KAC-2処理はせず、Ficoll-Conray法のみで分離) 2×10^5 /wellに対してPHA-LP反応では、phytohemagglutinin P (Difco)を最終濃度で $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、

ConA-LP反応ではconcanavalin A (Sigma)を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加した後72時間にわたり CO_2 incubator内で培養し、培養終了8時間前に ^3H -thymidine (^3H -TdR) $0.5 \mu\text{Ci}/\text{well}$ を加え、Wallac 1215 Rack Beta liquid scintillation counterにてリンパ球内酸不可溶性分画の放射活性をBray液添加により測定し、mitogenを添加しなかった時の放射活性との比であるstimulation index (SI)を求めた。

輸血の有無による分類では、前記17症例のうち術中ないし術直後に輸血を行った症例(輸血施行群)は術後2週に死亡した1例を除いて8例であり、術中・術後を通じて全く輸血を行わなかった症例(輸血未施行群)は残りの8例であった。これら16症例中、前者の平均年齢は62.1歳、肉眼進行度分類では、stage I: 1例、stage II: 1例、stage III: 4例、stage IV: 2例であり、輸血量は600ml~4800ml(平均 $1925 \pm 1707\text{ml}$)であった。後者の平均年齢は57.1歳、肉眼進行度分類ではstage I: 3例、stage II: 1例、stage III: 3例、stage IV: 1例であった。

なお、健常人26名の末梢血リンパ球を用いて同様の方法で測定したNK活性値、PHA-LP反応およびConA-LP反応SI値(mean \pm SD)はそれぞれ 43.6 ± 14.8 、 148.6 ± 72.8 および 109 ± 38.6 であった。

成績

1. 担癌体の術前後におけるNK活性の変動

担癌体17症例の術前、術後2日、1週、2週、3週におけるNK活性は図1に示したごとくである。術前のNK活性値は 25.9 ± 10.5 (平均値 \pm 標準偏差)であり、術後におけるNK活性値は漸増傾向を示し、3週では 32.7 ± 12.8 であったが、術前ならびに術後の各病日におけるNK活性値間に有意差は認められなかった。

2. 輸血のNK活性に及ぼす影響

輸血施行群と未施行群における術前後のNK活性値の変動を見たのが図2である。輸血施行群では術後3週のNK活性値は 28.8 ± 10.2 であり、術前値 20.6 ± 4.7 に比べ $p < 0.1$ で有意高値を示した。一方、輸血未施行群では術前のNK活性値 32.4 ± 11.5 に比べ、術後2日のそれは 24.3 ± 10.0 と $p < 0.1$ で有意低値を示した。しかし、術後1週以後の値との間には有意差はなかった。また、輸血施行群と輸血未施行群の術前後のそれぞれの時期におけるNK活性値間の有意差を調べたところ、術前値は $p < 0.02$ で輸血未施行群が有意高値を示したが、その他の各時期では有意差は認めら

図1 担癌体17例の術前後におけるNK活性の変動
(平均値±標準偏差)

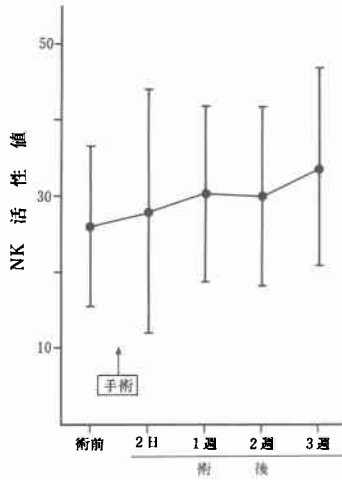


図3 術中輸血の有無と術前後のPHA-LP反応の変動

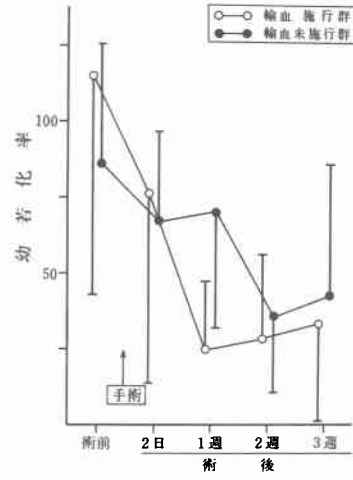


図2 術中輸血の有無と術前後のNK活性の変動

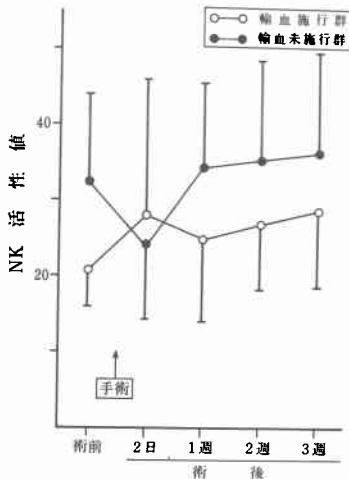
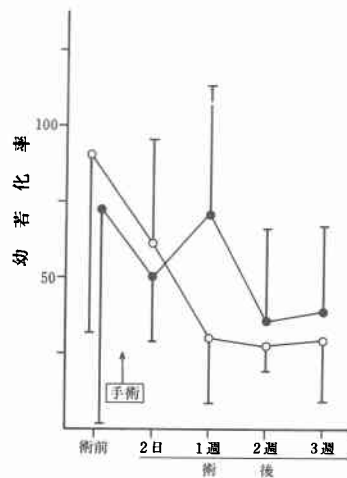


図4 術中輸血の有無と術前後のConA-LP反応の変動



れなかった。

3. PHA-LP反応ならびにConA-LP反応SI値の術前後における変動

輸血施行群におけるPHA-LP反応SI値の変動は図3に示したとおりであるが、術後2日におけるSI値は術前値に比べ低下してはいるものの有意差はなかった。一方、術後1週では術前に比べ $p < 0.02$ 、術後2週および3週では $p < 0.05$ で有意低下を認めた。また、輸血未施行群におけるそれは術後2日および1週では術前値に比べ低下傾向にあったが有意差はなく、術後2週では $p < 0.02$ 、術後3週では $p < 0.1$ で有意低下を認めた。また、術後3週ではSI値は上昇傾向に転じた。

次に、輸血の有無による比較では、術後1週においてのみ $p < 0.05$ で輸血未施行群が有意高値を示した。

ConA-LP反応の変動は図4に示したごとくであり、PHA-LP反応同様術後2日では術前値に比べ有意差はなく、術後1週から3週までは $p < 0.05$ で有意低下を認めた。輸血の有無による比較でも、PHA-LP反応と類似しており術後1週においてのみ $p < 0.05$ で輸血未施行群が有意高値を示した。

4. NK活性値とPHA-LP反応およびConA-LP反応SI値との相関

図5 術中輸血施行群における術前後のNK活性とPHA-LP反応との関係。術前後を通じてこの両者間に相関関係は認められない。

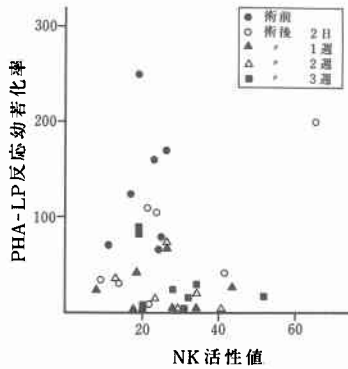


図6 術中輸血未施行群における術前後のNK活性とPHA-LP反応との関係。術前後を通じてこの両者間に相関関係は認められない。

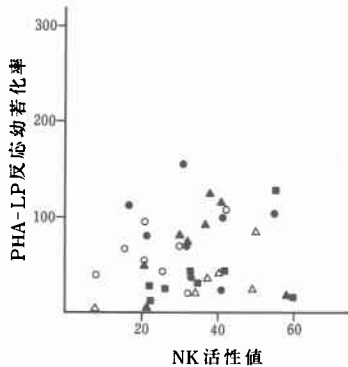


図7 術中輸血施行群における術前後のNK活性とConA-LP反応との関係。術前後の各時期におけるこの両者間に相関関係は認められない。

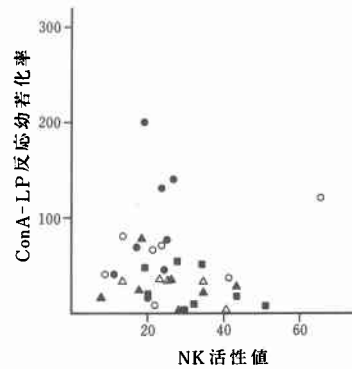
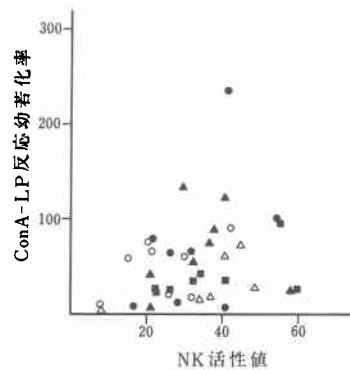


図8 術中輸血未施行群におけるNK活性とConA-LP反応との関係。術後2週目に $P < 0.05$ でこの両者に相関関係が認められたが、それ以外の各時期には相関関係は認められなかった。



輸血施行群におけるNK活性値とPHA-LP反応SI値との相関は図5のようである。これらの相関を順位相関法で求めると術前、術後2日、1週、2週および3週の順位相関係数はそれぞれ0.12, 0.54, -0.20および-0.38であり、この両者の術前後における値の間に相関関係は認められなかった。

輸血未施行群におけるNK活性値とPHA-LP反応SI値の関係は図6のようであり、その順位相関係数は術前、術後2日、1週、2週および3週でそれぞれ-0.50, 0.43, 0.45, 0.66および0.33と相関を認めなかった。

輸血施行群におけるNK活性値とConA-LP反応SI値との関係は図7に示すようであり、その順位相関係数は術前0.36, 術後2日0.18, 術後1週0.18, 術後

2週-0.31および術後3週-0.31であり、PHA-LP反応の場合と同様、両者間に相関関係は認めなかった。

輸血未施行群のNK活性とConA-LP反応間の関係は図8のようである。術前、術後2日、1週、2週、3週における相関係数はそれぞれ0.45, 0.36, 0.26, 0.83, 0.48であり、術後2週のみが $P < 0.05$ で相関を認めた。

5. PHA-LP反応とConA-LP反応間の相関

輸血施行群におけるPHA-LP反応とConA-LP反応SI値の間では術前で $P < 0.01$, 術後2日、1週および3週で $P < 0.05$ で相関関係が認められた。

輸血未施行群においても同様に術後2日、1週、2週および3週でそれぞれ $P < 0.01$ で相関があり、輸血の有無にかかわらずPHA-LP反応とConA-LP反応

図9 術中輸血施行群におけるPHA-LP反応とConA-LP反応との関係。術前後を通じこの両者間には相関関係が認められた。

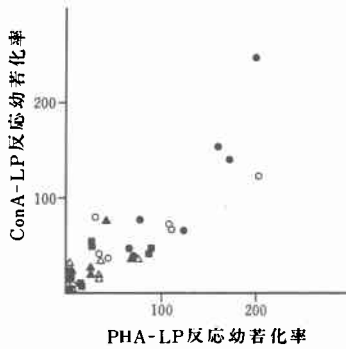
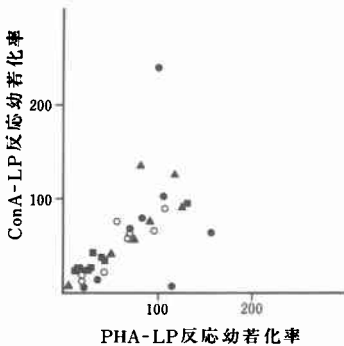


図10 術中輸血未施行群におけるPHA-LP反応とConA-LP反応との関係。術後の各時期で両者はよく相関している。



とはよく相関した(図9, 10)。

考 察

悪性腫瘍の治療には手術, 化学療法, 放射線などがあるが, 最近これらに加え非特異的免疫賦活剤の併用が担癌体の予後を改善する事が報告されている¹¹²⁾。一方, 手術直後の免疫能は種々の因子によって影響を受けており, 手術操作により術野に撒布された癌細胞の生着あるいは残存癌細胞の増殖のためには宿主の抵抗性が問題となり, この意味でも手術前後の免疫能を検討する意義は大きい。

免疫能の評価に使用されている指標としてはPHA, Con A, poke weed mitogen (PWM) などのmitogenによるLP反応, mixed lymphocyte culture (MLC) によるLP反応, 種々の皮膚反応, T細胞およびIgG・FcR⁺T細胞数の測定などがある。しかし, これらの指標は主にT細胞の機能を評価する手段であり, これは

多くのT細胞の機能を測定することにより, そのうちのほんの一部を占めるに過ぎない「腫瘍抗原を認識するT細胞群」の機能を推測しているのである。一方において生体の抗腫瘍性の一部を担うNK細胞機能の経時的評価を担癌体術後の免疫学的指標として用いる試みはほとんどなされていない。

冒頭で述べたようにNK細胞は前感作という段階を経ずにin vitroにおいて腫瘍細胞を傷害する細胞として見出されたものであるが³⁾⁻⁵⁾, その後生体内でもその活性の高低が発癌率すなわち発癌早期における抗癌性と直接関係あることが判った⁶⁾⁷⁾。手術直後の残存癌細胞の総数がどの程度であるかを明記した報告は見当たらないが, 術前と較べて癌細胞が非常に少なくなることは確かであり, 発癌早期にその機能を果すNK細胞の消長をこのような状況下において検索することは担癌症例の予後にとって非常に重要なことと推定される。

若杉ら⁸⁾は手術前後のNK活性値および悪性疾患患者のNK活性に対するOK-432の影響を調べており, 良性疾患では術後1週においてNK活性値が上昇するのに対し, 大部分の悪性疾患では術後1週で明らかかな低下を示したと報告しているが, この低下の意味に関しては腫瘍抗原による刺激の除去が一因であろうとしており, OK 432の投与がこの低下を防止し得ると述べている。

また, 大森⁹⁾は限局性腫瘍摘出例では上昇していたNK活性値の正常人レベルへの低下が認められたと報告しているが, 多様な因子が関係しており原因の解明は困難であるとしている。

本稿の結果では輸血施行群においてNK活性値が術後に漸増傾向を示し, 術後3週で $P < 0.1$ で有意高値を取る一方, 輸血未施行群では術後2日でNK活性の有意な低下を認めており, この両群間の年齢差, 病期進行度, 腫瘍摘出可能症例数には大きな相違がないと考えるとNK活性値の変動のずれは輸血に起因するものと考えるのが妥当であろう。

Herbermanら¹⁰⁾は動物実験において腫瘍を移植することによりNK活性が上昇する事実を報告しており, さらにallogeneicの骨髄細胞の前処置によってもNK活性が有意に上昇し, この現象はsyngenicの骨髄細胞では見られなかった¹¹⁾ので, HLAの異なる血液の移入がNK活性の上昇をもたらすことは当然と考えられ, 本稿の結果は首肯できるものである。輸血未施行群での術後2日におけるNK活性値の低下およ

び1週でのNK活性値の術前値への回復と若杉ら⁸⁾の結果との相違は両者間の症例ならびに測定条件の違いも一因と考えられるが、今後さらに症例をふやして検討していく必要があるものと思われる。

NK活性とPHA-LP反応あるいはConA-LP反応との間にほとんど相関が認められないという結果は、NK活性に関与する細胞とPHA-LPまたはConA-LP反応に関与する細胞が異なるという周知の事実以外に、手術侵襲その他多岐にわたる因子に対するおのおのの反応に関与する細胞の感受性ならびに反応性の相違に帰因するのであろう。少なくともT細胞のかなり広範囲なsubpopulationを賦活するPHAなどのmitogenによるLP反応とNK細胞という特殊な機能を持つ細胞の活性を同一の視点から担癌体術後の免疫能評価に用いず、おのおの独立した因子として考えることが必要と思われる。

Rothら¹²⁾は悪性腫瘍患者35名のPHA, ConAなどによるLP反応の術前後の変動を検討し、術後1日ないし1週でリンパ球機能が有意に低下し、術前値への回復に約4週を要したと報告し、本稿の図3, 図4とはほぼ一致している。これらの結果とNK活性が術直後より低下し、術後1週ではほぼ術前値に戻るという消長を考えると、術直後における抗腫瘍作用の主役をなすとも考えられるNK細胞の機能を保つことが、とくに担癌症例術後では重要と考えられる。

輸血の有無によるPHA, ConAによるLP反応の変動の相違は術後1週で著明に認められている。この両群間の差は病期進行度、年齢の相違がほとんどないことから考えて、輸血施行群での手術侵襲の大きさならびに出血による宿主固有のリンパ球数の減少と輸血により移入されたallogeneicなリンパ球の機能低下が主因と考えられる。

術前に有意差の存在した輸血施行群と未施行群間のNK活性値は術後には有意差を認めず、さらに輸血未施行群では術後2日のNK活性値は術前値に比べ有意低値を示した。また、手術侵襲の大きいと思われる輸血施行群ではPHA-LP反応ならびにConA-LP反応の術後における回復が遅延した。これらの事実は今後の術後免疫療法を考えるうえでの一助になるものと思われる。

文 献

- 1) 赤尾建夫, 藤本 茂, 伊藤文二ほか: 大腸癌症例に対する免疫化学療法の検討. 癌と化療 7: 1063—1067, 1980
- 2) 南 智仁: 消化器癌症例における手術前後の免疫学的指標の動態と免疫賦活剤の影響. 日癌治療会誌 16: 1248—1256, 1981
- 3) Takasugi M, Mickey MR, Terasaki PI: Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. Cancer Res 33: 2898—2902, 1973
- 4) Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH et al: Effect of antibody to θ antigen on cell-mediated immunity induced in syngeneic mice by murine sarcoma virus. J Natl Cancer Inst 51: 1509—1512, 1973
- 5) Kiessling R, Klein E, Pross H et al: "Natural" killer cells 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
- 6) Möller G, Möller M: Considerations of some current concepts in cancer research. J Natl Cancer Inst 55: 755—759, 1975
- 7) Schwarz RS: Another look at immunologic surveillance. New Engl J Med 293: 181—184, 1975
- 8) 若杉 尋, 宮田道夫, 森岡恭彦ほか: 悪性腫瘍患者の natural killer 細胞活性—手術の影響および OK-432の増強作用について. 医のあゆみ 113: 256—260, 1980
- 9) 大森景文: ヒトの Natural killer cell. 感染・炎症・免疫 9: 168—174, 1979
- 10) Herberman RB, Nunn ME, Holden HT et al: Augmentation of natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic target cells. Int J Cancer 19: 555—564, 1977
- 11) Herberman RB: Natural cell-mediated cytotoxicity in nude mice. The nude mouse in experimental and clinical research. Ed: Fogh J, Giovanella BC, Academic Press, New York, San Francisco & London, 1978, p135—166
- 12) Roth JA, Golub SH, Grimm EA et al: Effects of operation on immune response in cancer patients: Sequential evaluation of in vitro lymphocyte function. Surgery 79: 46—51, 1976