日消外会誌　18（1）：8～14，1985年

食道癌患者におけるnatural killer活性値の臨床的意義

秋田大学医学部第2外科
辻　和男　阿保七三郎　工藤　保
橋本　正治　川村　義宏

A CLINICAL STUDY ON NATURAL KILLER ACTIVITY IN THE PATIENTS WITH ESOPHAGEAL CANCER

Kazuo TSUJI, Shichisaburo ABO, Tamotsu KUDOO, Masaji HASHIMOTO and Yoshihiro KAWAMURA
Second Department of Surgery, Akita University School of Medicine

当教室の食道癌患者78例を対象に，切除再建手術及び免疫療法前後におけるnatural killer（NK）活性を測定し，種々の観点より検討した．その結果，食道癌患者のNK活性値は，血清アルブミン値やprognostic nutritional index（PNI）などの栄養指標と密接な相関性を有しており，OK-432による非特異的免疫療法の効果も，宿主の栄養状態によって大きく左右されることが判明した．また，術前stage IV食道癌症例のNK活性は明らかに低値を示したが，手術的治療に加え宿主の栄養状態改善を図ることにより，脆弱化したNK活性を十分回復させうることが判明した．以上の事実解明により，今後食道癌の治療成績向上の面で役立ちうるものと考えられた．

索引用語：食道癌患者のNK活性，担癌患者の栄養状態とNK活性

I. 緒　言

抗原刺激とは無関係に腫瘍細胞障害活性を有するnatural killer（NK）細胞が，生体の腫瘍監視機構の中で重要な役割を担っているとの報告[1)2)]が，近年注目されつつある．担癌患者の全身状態や免疫療法の効果を示す指標として，このNK細胞活性が有する特性を十分把握しておくことは，その適切な治療法を選択して，治療効果の向上を期待するうえで，極めて重要と考えられる．

特に，食道癌患者においては，比較的早期よりみられる栄養障害に加え，長時間にわたる手術操作及びそれに伴う麻酔や輸血など，種々の因子が担癌宿主の免疫反応に複雑な影響を及ぼすことが推定され，治療過程におけるNK活性の変動の意義を解析するのは必ずしも容易ではない．以上の観点より，著者らは様々な角度から食道癌患者のNK活性値に対して検討を加え，若干の知見を得たので，文献的考察を加えて報告する．

＜1984年10月17日受理＞別刷請求先：辻　和男
〒010　秋田市本道1－1－1　秋田大学医学部第2外科

II. 検索対象

昭和56年4月より昭和59年5月までの約3年間に秋田大学第2外科で取扱った食道癌患者78例を対象とした．年齢分布は43歳～81歳（平均61歳）で，性別は男性70例，女性8例であった．これらの患者の外科的治療は一期的切除再建が75例であり，非切除は3例であった．切除例を病期別にみると，stage 0 7例，stage I 3例，stage II 6例，stage III 24例，stage IV 35例であった．

なお，このほか，健常成人33名についてもNK活性値を測定し，食道癌患者の測定値と比較検討した．

III. 検査方法

ヒト末梢血リンパ球のNK活性測定法（図1）は，検査対象例の末梢血7～8mlをヘパリン加採血し，phosphate buffer saline（PBS）により2倍希釈した後，Ficoll-Isopaque比重遠心法にて単核球を分離しeffector細胞とした．また，ヒト慢性骨髄性白血球由来の株化細胞K-562に100μCiの$Na_2{}^{51}CrO_4$を加え，1時間標識した後，培養液で4回洗浄し，10%ウシ胎児血

清（FBS）加RPMI 1640培養液に浮遊させ，target細胞とした．先に調整したeffector細胞とtarget細胞を一定の比率でマイクロテストプレートに入れ，37℃で4時間混合培養を行った．マイクロテストプレートの各well内より上澄100μlを採取して，オートガンマカウンターにより2分間ずつcountし，図1の算定式に基づき特異的%^{51}Cr放出値を算出して，これをNK活性値とした．

なお，NK活性値の高低が，NK細胞数の多寡に関係しているか否かを検討する目的で，NK細胞の大部分を認識するといわれるmonoclonal抗体Leu 7を使用してLeu 7陽性細胞数を測定した．すなわち，食道癌患者15例の末梢血50μlをPBSにて2倍希釈した後，FITC標識Leu 7抗体2.5μlを加え，4℃にて1時間反応させ，さらにPBSにて1回洗浄後，lysing reagentを加えて赤血球を溶血させ（室温10～15分間），レーザーフローサイトメーター（Ortho社製，Spectrum III）で，Leu 7陽性細胞の比率と絶対数を測定した．

IV．検査成績

1．食道癌患者の栄養状態とNK活性値について

癌患者の栄養状態を示す指標である血清アルブミン値及びBuzbyのprognostic nutritional index（PNI）[3]と，そのNK活性との関連性について検討した．その結果，食道癌患者においては血清アルブミン値とNK活性の相関係数が，術前r＝0.727，術後r＝0.735となり，おのおの有意（p＜0.001）の相関性が認められた（図2）．さらに患者の栄養状態とNK活性の正の相関関係は，同一患者の治療経過過程においても認められた．図3は，食道気管支瘻を伴ったstage IV症例の血清アルブミン値とNK活性値の変動を示したもので，両者はほぼ並行して変動しており，極めて強い相関性が示唆された．

とくに，食道癌20症例を無差別に選出し，PNI値と

図1　NK活性測定法

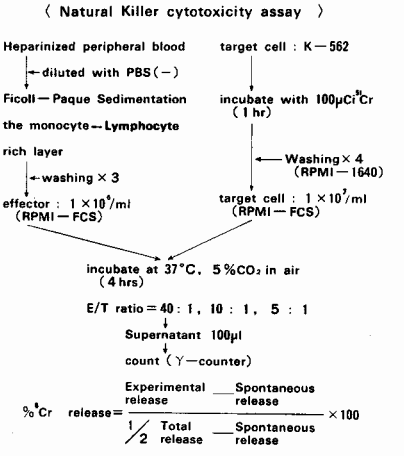


図2　食道癌患者における血清アルブミン値とNK活性との相関

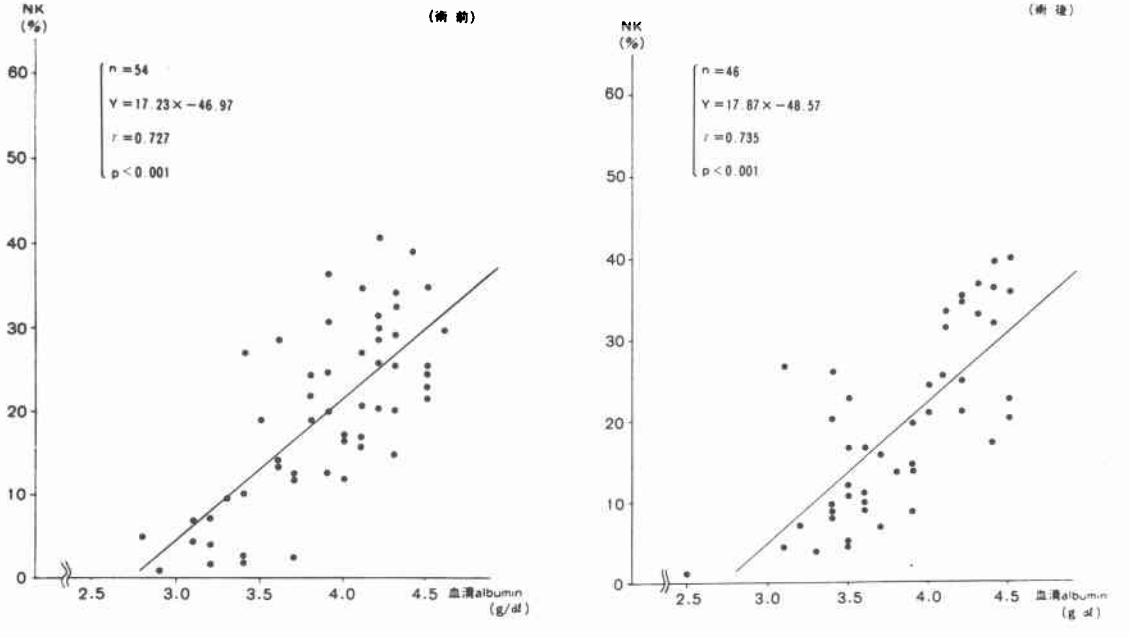
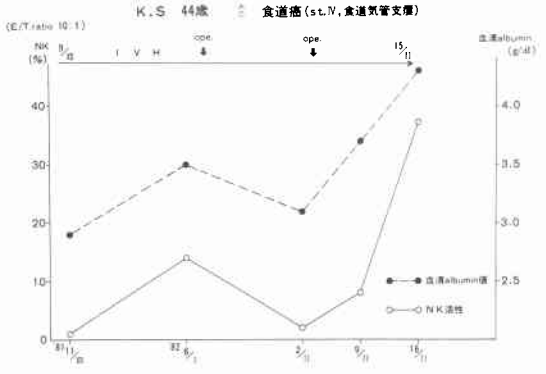


図 3　食道癌患者の血清アルブミン値と NK 活性の推移

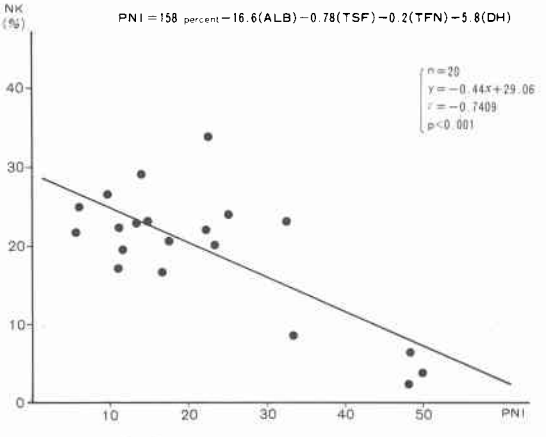


NK 活性値との関連性を検討した結果，PNI 値が40以下の症例では NK 活性値が22.15±5.43%であったのに比べ，PNI 値が40以上の群では4.47±2.07%と明らかに低値を示し，両群間に明らかな有意差（$p<0.01$）が認められた．この場合，PNI と NK 活性の相関係数は，$r=-0.741$で，両者の有意（$p<0.001$）に負の相関関係を呈示した（**図 4**）．

2．食道癌患者の外科治療前後における NK 活性値の変動

各症例を癌の進行度別に分類して，おのおの術前，術後における NK 活性値を比較検討した．なお，栄養管理上ほとんど全症例において経中心静脈高カロリー輸液法を実施した．

図 4　食道癌患者における PNI と NK 活性の関連（E/T. Ratio. 10：1）



ALB：血清 albumin，TSF：Triceps skinfold，TFN：血清 transferrin，DH：delayed hypersensitivity

進行度別にみた食道癌患者の NK 活性値（**図 5**）は，治療療前値で，stage 0群34.3±13.7%，stage I～II 群25.5±4.72%，stage III 群26.8±8.97%，stage IV および切除不能群11.9±7.82%であり，健常人と比較すると，stage IV および切除不能群が著明に低値を示し，明らかに有意差（$p<0.001$）を認めた．

一方，術後における NK 活性値は，stage 0, stage I～II, stage III の各群においては，術前値との比較では有意差は認められず，ただ stage IV 群で術後の栄養改善に関与して，術前後で NK 活性値の有意（$p<0.01$）

図 5　食道癌患者の NK 活性（治療前）（E/T. 比，10：1）

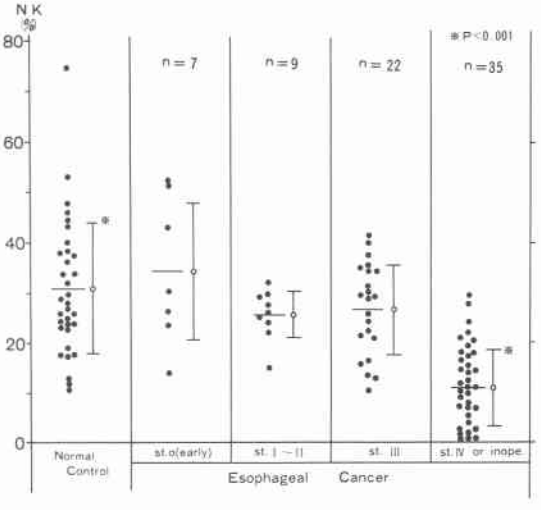
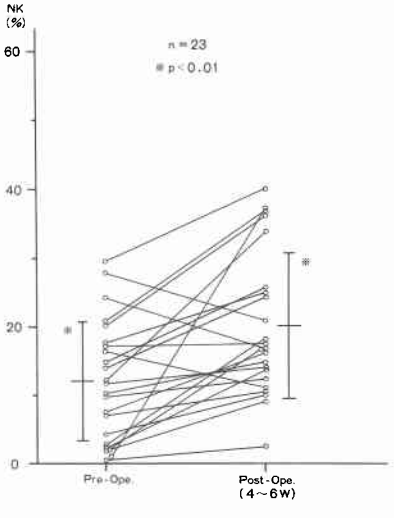


図 6　食道癌患者（st. IV）の手術前後における NK 活性の変動（E/T. 比，10：1）



の上昇が観察された（図6）.

3. Leu 7陽性リンパ球数とNK活性値との関連

NK活性値のNK細胞数依存性を検討する目的で，Leu 7陽性リンパ球数を測定したが，治療前における患者末梢血のLeu 7陽性リンパ球数は，599.8±328.3個/μlであり，同時に測定したNK活性値を図7に示し検討した．すなわちLeu 7陽性リンパ球数とNK活性値の相関係数は，r＝－0.114で，結局両者間に有意の相関性は認められなかった．

4. OK-432皮内投与（非特異的免疫療法）前後におけるNK活性値の変動について

外科治療後の食道癌患者17例について，非特異的免疫療法としてOK-432の皮内投与を施行した．投与量は，1KE（0.1mg）より開始し，2, 5, 10KEと隔日ごとに増量して，最終的に1週当り20～40KEを維持量とした．なお，免疫療法期間中，一部の症例でFT-207（400～600mg）を併用した．

その結果，OK-432の皮内投与により多くの癌患者で，NK活性値の上昇が観察された．しかし，投与後もまれにNK活性値が上昇しない症例もあり，この原因追求のため，すでにNK活性値と有意の相関性を認めた血清アルブミン値を指標に，OK-432投与群との関連性について検討した．

図8の症例は，56歳男性で，術後栄養状態の回復した時点（血清アルブミン値4.0g/dl以上）において，OK-432投与を試みた．その結果，総量30KE投与直後から著明なNK活性の上昇を認め，その後の継続投与によっても，投与前にくらべ明らかに高値が維持された．

そこで，非特異的免疫療法を施行した全症例について栄養状態別に2群に分類して，OK-432のNK活性値に及ぼす影響について比較検討した（図9）．その結果，血清アルブミン値3.5g/dl以上の群では，OK-432投与によりNK活性値が有意（p＜0.001）に上昇をみたが，3.5g/dl以下の群では低値を持続し，OK-432の効果は宿主の栄養状態に強く依存性を有することが明確となった．

図7　NK活性とLeu 7陽性リンパ球数との関連（食道癌患者）（E/T. 比，10：1）

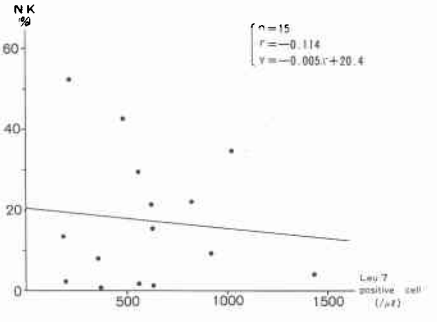


図8　OK-432投与によるNK活性の変動（症例）

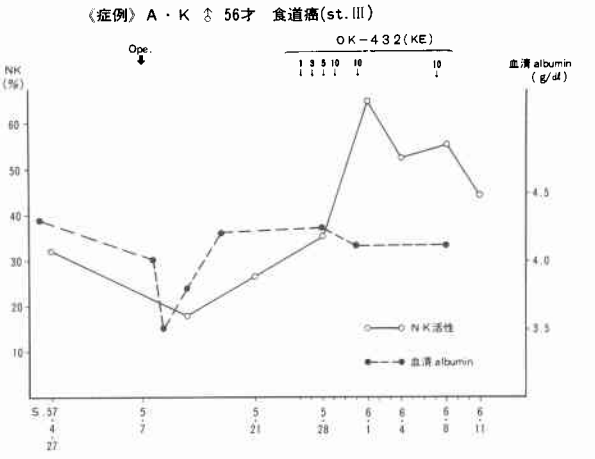
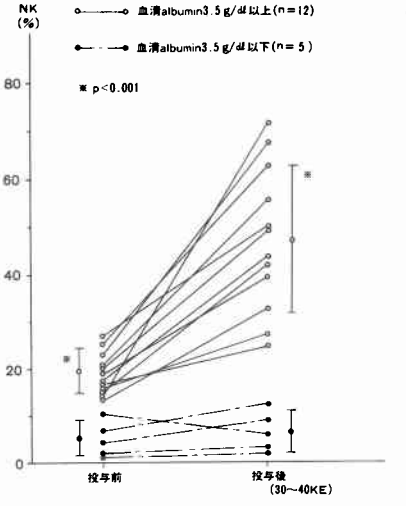


図9　OK-432皮内投与によるNK活性の変動（E/T. Ratio, 10：1）



V. 考　察

1973～1975年頃，正常人および未処置動物のリンパ系細胞がin vitroで癌細胞に細胞障害性を及ぼす現象（natural killing）が相次いで報告され[4)～6)]，このNK現象に関与している効果細胞はKiesslingら[5)]によってnatural killer cellと命名された．発見当初は，発癌に対する生体の免疫監視機構との関連性が特に強調され

たが，その後の研究により，生体内でのNK細胞の果す役割は多岐多様にわたることが浮彫りにされ，Riccardi[7]やHannaら[8]によって，in vivoにおけるNK細胞の腫瘍破壊作用や，転移抑制効果などが実験的に確認されるに及んで，特に担癌生体内におけるNK細胞の果す役割の重要性が近年，一層強く認識されるに至った．

また従来より，栄養状態と生体の感染防御能との間の密接な関連性が明らかにされてきたが[9]，さらに最近の免疫学の進歩に伴い，栄養改善が感染免疫のみならず，腫瘍免疫や移植免疫においても重大な関連性を有することが指摘されてきた[10][11]．しかし，かかる栄養状態がNK活性にどのような影響をもたらすかを詳細に論じた報告は少なく，わずかにAkimotoら[12][13]が，低蛋白食で飼育したC3H/HeマウスのYAC-1細胞に対するnatural cytotoxityを調査し，正常飼育マウスと比較して低下傾向にあり，低栄養状態のマウスではOK-432やLentinanなどの免疫賦活剤を投与してもNK活性の増強はみられないことを報告し，Fernandes[14]は，亜鉛欠乏のC57BL/KsマウスにおいてNK活性が低下すると述べているにすぎない．

一方，MacFarlane[15]は，低栄養状態の動物においてはコルチコステロイド分泌が増加する事実を指摘しているが，ステロイドホルモン自体がNK活性の低下を惹起する薬剤であることを勘案すると，人体においては低栄養状態により誘発されるストレスによってステロイドホルモン分泌亢進がおこり，NK活性低下が招来する機構が容易に推定される．

今回，著者らの研究により，臨床的に蛋白栄養障害がNK活性低下をもたらす事実が明確となったが，栄養状態を正確に示すパラメーターが確立していない現状からすれば，少なくとも現時点では，可能な限り多くの栄養因子と生体の免疫能の関連について十分な検討がなされるべきと考える．

特に，食道癌患者におけるNK活性値やNK細胞自体に関する詳細な報告は，これ迄皆無に等しく，わずかに，多幾山ら[16]が胸部食道癌11例のKATO III細胞に対するNK活性値を測定し，健常者及び胃癌患者と比較して有意に低値を示したと報告しているにすぎない．

今回著者らの検討した成績では，食道癌症例でも病期の比較的早いstage 0～III群では，NK活性値の有意な低下は認められず，stage IV群や切除不能群といった進行癌症例において，著明に低値を示した．この点，腫瘍の初期においてはNK活性値の低下は認められないとするTakasugi[17]やEreminら[18]の報告とほぼ一致する成績が得られた．

一方，手術侵襲が生体の免疫系に及ぼす影響に関しては，術後一過性のリンパ球絶対数の減少，特にTリンパ球の著明な減少[19][20]やMLRでの反応性低下[21]，PHAに対する幼若化能の低下[19][22]などがみられ，しかもこれらは一般に術後1～2週間で回復する事実が指摘されてきた．今回著者らの検索成績では，術前低いNK活性値を示したstage IVの食道癌患者においても，手術による癌病巣の切除と栄養状態の改善に伴って，術後はNK活性値が著明に上昇することを確認したが，この事実は担癌患者免疫能が，手術侵襲や宿主の栄養状態によって大きく左右されることを示唆していると考える．

さらに1981年，Aboら[23]によって開発されたLeu 7(HNK-1)抗体は，ヒトNK細胞の“実体”であるlarge granular lymphocyte（LGL）の大部分を認識するモノクローナル抗体であり，この抗体開発によって生体内のNK細胞の分布状態など，飛躍的に多くの知見が得られるようになったのは事実である．今回著者らの検討では，食道癌患者末梢血中のLeu 7陽性細胞数とNK活性値との間に，有意の相関性を見出しえなかった．この事実からすれば，生体内では多くのNK細胞が存在しても，何らかの抑制機構が働くために十分な殺細胞効果を期待できないことがあるものと推定された．かかるNKに対する抑制機構としては，近年サプレッサー細胞の関与が予測されており，Gersonら[24]は，動物実験成績からNK細胞活性は，サプレッサーマクロファージによって抑制される可能性が強いことを指摘し，またUchidaら[25]も，癌性胸水中のNK細胞が主にマクロファージを中心としたサプレッサー細胞によって，その活性を抑制される事実を報告している．ヒトでは，サプレッサー細胞によるNK活性調節機構の解明はいまだ十分なされていないため，今後この面からの検討が大いにまたれるところである．

近年OK-432など多くの非特異的免疫賦活剤が臨床応用の段階にはいり，癌患者の全般的な免疫能をたかめ，悪性腫瘍に対する治療効果が大いに期待されつつあるが，これら免疫adjuvantの多くはinterferonを誘発してNK活性を増強させることが確認[26]～[28]されており，賦活化されたNK細胞がキラーT細胞，マクロファージなどとともに，癌細胞破壊に関与しているものと考えられている．担癌患者におけるOK-432投

与の免疫学的効果について，若杉ら[29]は初回筋注後3日目にピークを示す一過性の著明なNK活性上昇を認めたと報告しているが，著者らは筋注ではなく，Uchidaら[30]の方法に準じOK-432の皮内投与を実施した結果，リンパ球数の増加，T細胞分画の正常化，NK活性の著明な上昇など種々の免疫学的効果が観察され，また10～20KEの大量one shot投与によっても悪寒・発熱をみた症例は約20%に止まり，僅少の副作用で十分な効果を確認できた．事実，皮内組織はリンパ管に富み，マクロファージを中心とする細網内皮系の抗原情報伝達細胞やリンパ球が豊富に存在するなど，組織学的特異性を有することから，OK-432が免疫担当細胞を賦活する部位として，皮内は最適な組織の1つであろうと考えられた．

なお，今回の著者らの検索成績では，これら免疫学的効果は栄養状態によって大きく左右され，血清アルブミン値が3.5g/dl以下の低栄養癌患者では，NK活性の増強はほとんど期待されず，OK-432投与に際しては，特に栄養状態を重視して投与すべきであり，症例の好適な時期に適切な部位をえらび投与することにより，その効果は大いに期待できよう．

食道癌患者のNK活性に関する今回の臨床的研究により，いくつかの新知見が得られた．この中で最も興味深い点は，進行癌であるstage IV症例においても，手術的治療に加え宿主の栄養状態改善を図ることにより，低下した免疫状態，特に脆弱化したNK活性を十分回復させうるということである．逆に，低栄養状態における非特異的免疫療法では，その効果はほとんど期待し難いことから，担癌宿主の栄養状態がNK活性と極めて密接な関係を有している事実を臨床的に確認できた．この事実は今後，食道癌治療成績向上の面で大いに役立ちうるものと考える．

文　献

1) Herberman RB, Djeu JY, Kay HD: Natural killer cells: Characteristics and regulation of activity. Immunol Rev 44：44—70, 1979
2) Becker S: Intratumor NK reactivity. In Natural Cell-Mediated Immunity Against Tumors. Edited by RB Herberman. New York, Academic Press, 1980, p985—996
3) Buzby GP, Mullen JL, Matthews DC: Prognostic nutritional index in gastrointestinal surgery. Am J Surg 139：160—167, 1980
4) Takasugi M, Mickery MR, Terasaki PI: Reactivity of lymphocytes from normal person on cultured tumor cell. Cancer Res 33：2898—2902, 1973
5) Kiessling R, Klein E, Pross H et al: Natural killer cells in mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. Eur J Immunol 5：112—117, 1975
6) Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. Int J Cancer 16：216—229, 1975
7) Riccardi C, Santoni A, Barlozzari T et al: Role of NK cells in rapid in vivo clearance of radiolabeled tumor cells. In: Natural Cell-Mediated Immunity Against Tumors. Edited by RB. Herberman New York, Academic Press, 1980, p1121—1139
8) Hanna N, Burton RC: Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis in vivo. J Immunol 127：1754—1758, 1981
9) Law DK, Dudrick SJ, Abdou NI: The effects of protein calorie malnutrition on immune competence of the surgical patient. Surg Gynecol Obstet 139：257—266, 1974
10) McHugh MI, Wilkinson R, Elliott RW et al: Immunosuppression with polyunsaturated fatty acids in renal transplantatien. Transplantation 24：263—267, 1977
11) 西平哲郎, 秋元　実, 平山　克ほか：癌患者の栄養と免疫能．輸液栄ジャーナル　2：257—263, 1980
12) 秋元　実, 西平哲郎, 葛西森夫ほか：低蛋白栄養下におけるマウス免疫能の検討．臨免疫　13：396—402, 1981
13) 秋元　実, 西平哲郎, 葛西森夫ほか：蛋白カロリー摂取とマウスNatural Killer活性の変化．日癌会40回総会記．1981, p128
14) Fernandes G, Nair M, Onoe K et al: Impairment of cell-mediated immunity functions by dietary zinc deficiency in mice. Proc Natl Acad Sci USA 76：457—461, 1979
15) McFarlane H: Cell-mediated immune response in malnutrition. Clin Exp Immunol 13：153—164, 1973
16) 多幾山渉, 峠　哲哉, 柳川悦朗ほか：胸部食道がん患者における細胞性免疫能の検討．日胸外会誌 30：1428—1433, 1982
17) Takasugi M, Ramseyer A, Takasugi J: Decline of natural nonselective cell-mediated cytotoxicity in patients with tumor progression. Cancer Res 37：413—418, 1977
18) Eremin O, Ashby J, Stephens JP: Human natural cytotoxicity in the blood and lymphoid

organs of healthy donors and patients with malignant disease. Int J Cancer 21：35—41, 1978
19) Slade MS, Simmons RL: Immunodepression after major surgery in normal patients. Surgery 78：363—372, 1975
20) 曲直部寿夫，白倉良太，森　隆：心臓外科と免疫．血と脈管 6：271—284, 1975
21) Munster AM, Eurenius K, Katz RM et al: Cell-mediated immunity after thermal injury. Ann Surg 177：139—143, 1973
22) Riddle PR, Berenbaum MC: Postoperative depression of the lymphocyte response to phytohaemagglutinin. Lancet 1：746—748, 1967
23) Abo T, Balch CM: A differentiation antigen of human NK and K cells identified by monoclonal antibody (HNK-1). J Immunol 127：1024—1029, 1981
24) Gerson JM, Varesio L, Herberman RB: Systemic and in situ natural killer and suppressor cell activities in mice bearing progressively growing murine sarcoma-virus-induced tumors. Int J Cancer 27：243—248, 1981
25) Uchida A, Micksche M: Suppressor cells for natural killer activity in carcinomatous pleural effusions of cancer patients. Cancer Immunol Immunother 11：255—263, 1981
26) Djeu JY, Heinbaugh JA, Herberman RB et al: Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers. J Immunol 122：175—181, 1979
27) Thatcher N, Swindell R, Crowther D: Effects of Corynebacterium parvum and BCG therapy on immune parameters in patients with disseminated melanoma. Clin Exp Immunol 35：171—185, 1979
28) 海老名卓三郎，栄井　明，石田名香雄ほか：免疫賦活剤によるインターフェロン誘起とNK細胞活性増強作用．医のあゆみ 117：229—234, 1981
29) 若杉　尋，押味和夫，森岡恭彦ほか：溶連菌製剤OK-432投与方法によるNK活性増強作用の臨床的検討．医のあゆみ 115：442—444, 1980
30) Uchida A, Hoshino T: Clinical studies on cell-mediated immunity in patients with malignant disease. I. Effect of immunotherapy with OK-432 on lymphocyte subpopulation and phytomitogen responsiveness in vitro. Cancer 45：476—483, 1980