

# 癌性および結核性胸膜炎における IL-2 産生能 およびLAK活性の検討

黒 岩 靖  
信州大学医学部第1内科学教室  
(主任: 草間 昌三教授)

## Immunological Study of Patients with Carcinomatous and Tuberculous Pleurisy —IL-2 Production in PPD-induced Cytotoxicity and LAK Activity—

Yasushi KUROIWA

*Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine*  
(Director: Prof. Shozo KUSAMA)

In order to elucidate the immunological difference between peripheral blood and pleural effusion, PPD-induced IL-2 production and LAK activity were examined in 13 patients with carcinomatous pleurisy and 11 patients with tuberculous pleurisy. PPD-induced IL-2 production from mononuclear cells (MNC) was higher in pleural effusion than in peripheral blood in both patients with cancer and tuberculosis patients. PPD-induced IL-2 production from MNC in pleural effusion was higher in tuberculosis patients than in cancer patients. LAK activity in cancer patients was lower in pleural effusion than in peripheral blood. LAK activity of MNC in tuberculous pleural effusion was divided into two groups, one high and the other low. The low cytotoxicity of carcinomatous effusion was suggested to be due to impaired cytotoxic function of MNC at effector phase as well as at effector phase. *Shinshu Med. J.*, 35: 783-792, 1987

(Received for publication June 30, 1987)

**Key words:** carcinomatous pleurisy, tuberculous pleurisy, interleukin-2, lymphokine-activated killer activity, NK activity

癌性胸膜炎, 結核性胸膜炎, インターロイキン2, LAK活性, NK活性

### I 緒 言

胸水貯留を来す疾患は、腫瘍、炎症、循環不全、膠原病等、多岐にわたることが知られている。これらのうち臨床的によく認められる疾患としては腫瘍と肺結核によるものが多い。われわれはこれまで結核性胸膜炎において末梢血と胸水の T 細胞サブセット、natural killer (NK) 細胞および NK 活性につき検討してきた<sup>1)-3)</sup>。

NK 細胞とは免疫されていない個体のリンパ球の腫瘍細胞に対する傷害活性を示す細胞と定義されており、その活性の測定には、ヒトにおいては NK 感受性の K562 が target cell として使用されている。われわれは以前、結核菌陽性の胸水の NK 活性は末梢血に比較して高値を示すことを報告した<sup>3)</sup>。このことは胸水中の結核菌由来因子が胸水の NK 活性を増強していることを示唆している。そこで今回は結核菌由来である精製ツベルクリン (PPD) 存在下で癌性および結核

性胸膜炎の単核球を培養しその細胞傷害活性を検討しさらに NK 活性の増強に関与すると言われている interleukin-2 (IL-2) の産生を検討した。

一方、リンパ球を IL-2 とともに培養すると、種々の腫瘍細胞株あるいは自己の細胞に対して傷害活性を有する lymphokine-activated killer (LAK) 細胞が誘導されることが知られている<sup>4)-7)</sup>。今回はこの LAK 活性を癌性および結核性胸膜炎の末梢血、胸水につき検討し、癌と結核および末梢血と胸水の免疫反応の相違につき検討した。

## II 対象および方法

### A 対 象

癌性胸膜炎は13例（男性8例，女性5例，年齢34～80歳，平均年齢54.2）であり，その内訳は，原発性肺癌12例（腺癌11例，扁平上皮癌1例），転移性肺腫瘍1例（喉頭癌）であった。結核性胸膜炎は11例（男性8例，女性3例，年齢24～83歳，平均年齢56.2）であった。対照として健常者17例（男性9例，女性8例，年齢22～78歳，平均年齢48.6）を選び，両疾患例にほぼ年齢分布を合わせた。

癌性胸膜炎の確定診断は，胸水の細胞診，気管支鏡下の擦過細胞診または生検組織診，および剖検所見によった。結核性胸膜炎の診断は，ツベルクリン反応，胸水，喀痰，および気管支肺胞洗浄液からの結核菌の検出および臨床経過によった。なお，IL-2 産生能および LAK 活性の検討はすべて治療前に行った。

### B 方 法

#### 1 単核球の分離

単核球は以前に報告した方法に従って分離した<sup>1)</sup>。略述すると，癌性および結核性胸膜炎患者から採取した heparin 添加末梢血（30～40ml）を，RPMI 1640 (GIBCO, USA) を加えて2～3倍に希釈した後，Lymphoprep (Nyegaard Co. Norway) に重層し，400G で30分間遠心した。遠心後，単核球を中間層より採取し，RPMI 1640 で3回洗浄した。健常者の単核球も heparin 添加末梢血から上記と同様の操作により採取した。Heparin 添加の癌性および結核性胸水（50～300ml）は末梢血と同日に採取し，300G で10分間遠心後，細胞成分を分離し RPMI 1640 に浮遊した。Lymphoprep に RPMI 1640 に浮遊した結核性胸水より得た細胞成分を重層し，400G で30分間遠心後，中間層より単核球を採取した。また，癌性胸水では癌細胞を除く目的で細胞成分を 100% Lymphoprep

と75% Lymphoprep に重層し 400G で30分間遠心後，単核球層を採取した。さらに nylon-wool column を用いてリンパ球 rich な単核球を得た。なおこの方法<sup>8)</sup>により，腫瘍細胞の混入率は1%以下となった。

#### 2 PPD 添加による単核球の細胞傷害活性

健常者単核球（ $2 \times 10^6$ /ml）を，至適濃度<sup>1)</sup>の PPD（12.5 $\mu$ g/ml，日本 BCG Co.）添加群と非添加群に分け，円錐 tube (Falcon 2095, USA) を用いて37°C，5%CO<sub>2</sub> 存在下で4日間培養し，細胞傷害活性を4日間毎日測定して至適培養時間を決定した。癌性および結核性胸膜炎の末梢血，胸水単核球（ $2 \times 10^6$ /ml）も健常者末梢血と同様に PPD 添加群（12.5 $\mu$ g/ml），非添加群に分け，至適時間培養後，細胞傷害活性を測定した。

また，培養上清は 200G，10分間遠心後に採取し，IL-2 測定のため-80°C に保存した。

#### 3 単核球の細胞傷害活性

以前報告した方法に準じて測定した<sup>3)</sup>。すなわち target cell (K562 および Raji) のラベリングは Na<sub>2</sub><sup>51</sup>Cr O<sub>4</sub> (NEN Co. USA) (50 $\mu$ Ci～100 $\mu$ Ci) を使用した。Effector cell（ $1 \times 10^5$ ）と target cell（ $1 \times 10^4$ ）の比（E/T ratio）は10：1であり，全量を 200 $\mu$ l とし micro titer plate (U type, Nunc Co., Denmark) で37°C 4時間培養した。培養後，300G 10分間遠心し採取し，上清（100 $\mu$ l）の radioactivity をガンマカウンターにより測定した。Cytotoxicity (%) は次式より算出した。

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{R_E - R_S}{R_{\text{Max}} - R_S} \times 100$$

R<sub>Max</sub> (maximum <sup>51</sup>Cr release)  
R<sub>S</sub> (spontaneous <sup>51</sup>Cr release)  
R<sub>E</sub> (experimental <sup>51</sup>Cr release)

#### 4 LAK 活性

健常者末梢血単核球より nylon-wool column を用いて adherent cell を除去し単核球を分離した。単核球（ $2 \times 10^6$ /ml）を recombinant IL-2 (rIL-2) (武田薬品，大阪) の添加群（おのおの  $2 \times 10^{-3}$ ， $2 \times 10^{-2}$ ， $2 \times 10^{-1}$ ，2， $2 \times 10$  unit）と非添加群に分け multi-well (Falcon 3047, USA) で8日間，37°C，5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養し，毎日細胞傷害活性を測定した。癌性および結核性胸膜炎例の末梢血および胸水単核球の LAK 活性は，上述の方法で得られた単核球や結核性胸水単核球より nylon-wool column を用いて単核球を得た

後、 $2 \times 10^6$ /ml に調整し、至適 rIL-2 添加群、非添加群に分け至適培養後、細胞傷害活性を測定した。

5 IL-2 測定

IL-2 産生の測定は Farrar らの方法<sup>9)</sup>に準じて行った。略述すると、培養上清 (0.1ml) の 2 倍希釈列とスタンダードの IL-2 の 2 倍希釈列を作成し、それぞれに IL-2 依存性 mouse cell line である CTLL-2 ( $1 \times 10^4$ /0.1ml) を加え 20 時間培養後、 $0.5 \mu\text{Ci}$  の  $^3\text{H-TdR}$  を添加し、さらに 4 時間培養した。CTLL-2 細胞の  $^3\text{H-TdR}$  の取り込みは液体シンチレーションカウンターで測定した。スタンダード IL-2 と実験培養上清の CTLL-2 への  $^3\text{H-TdR}$  の取り込みを対数表示し、スタンダード IL-2 の maximum の  $^3\text{H-TdR}$  の取り込みの 50% の点の希釈率より IL-2 の量を算出した。

6 リンパ球表面抗原の解析

末梢血、癌性および結核性胸水リンパ球を PPD 添加群と非添加群に分け 18 時間、 $37^\circ\text{C}$  5% $\text{CO}_2$  存在下で培養後、NK 細胞上の IL-2 receptor につき検討した。モノクローナル抗体 (mAb) は IL-2 receptor に対する FITC 標識の抗 IL-2-R1 (Counter Co, USA)

および PE 標識の抗 Leu-11c (Becton Dickinson, USA) を使用した。

癌性および結核性胸膜炎の末梢血および胸水単核球 ( $2 \times 10^5$ /0.1ml) を 3 群に分け、①抗 IL-2-R1 mAb-FITC ( $8 \mu\text{l}$ ) ②抗 Leu-11c mAb-PE ( $5 \mu\text{l}$ ) ③抗 IL-2-R1 mAb-FITC ( $8 \mu\text{l}$ ) + 抗 Leu-11c mAb-PE ( $5 \mu\text{l}$ ) の各モノクローナル抗体と氷上で 30 分 0.1%  $\text{NaN}_3$  存在下で反応させた。その後 0.1% albumin を含む phosphate buffered saline (PBS) を加えて 300G で 10 分間遠心して 2 回洗浄し、flow cytometry (EPICS V, Coulter Co, USA) を用いて NK 細胞上の IL-2 receptor につき検討した。

7 統計的解析

有意差検定は、Student's t-test にて行い、統計的有意の水準は、 $p < 0.05$  とした。

III 結 果

A PPD 添加による単核球の細胞傷害活性

健常者の至適 PPD 添加による、細胞傷害活性の time-course を Fig. 1 および Fig. 2 に示す。PPD 添加 18~24 時間後に細胞傷害活性は最高値を示した。

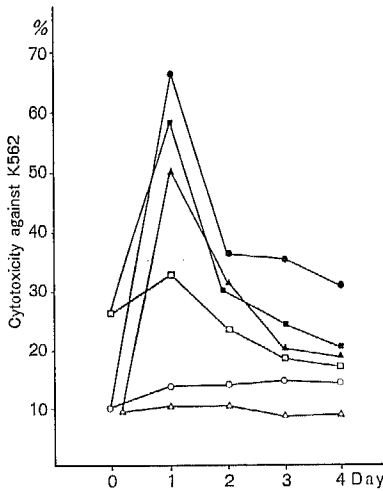


Fig. 1 Time course of PPD-induced cytotoxicity against K562.

- Case 1 ● PPD-induced cytotoxicity
- medium induced cytotoxicity
- Case 2 ■ PPD-induced cytotoxicity
- medium induced cytotoxicity
- Case 3 ▲ PPD-induced cytotoxicity
- △ medium induced cytotoxicity

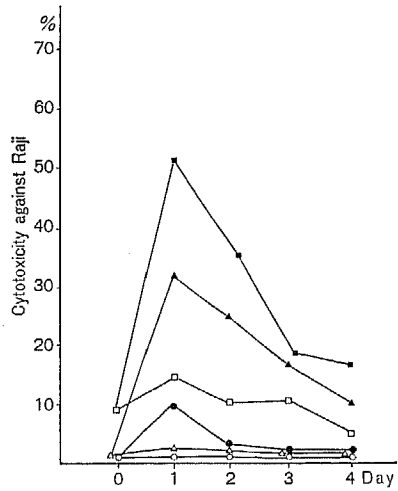


Fig. 2 Time course of PPD-induced cytotoxicity against Raji.

- Case 1 ● PPD-induced cytotoxicity
- medium induced cytotoxicity
- Case 2 ■ PPD-induced cytotoxicity
- medium induced cytotoxicity
- Case 3 ▲ PPD-induced cytotoxicity
- △ medium induced cytotoxicity

Table 1 PPD-induced cytotoxicity of mononuclear cells against K562 and Raji in cancer and tuberculosis patients with pleural effusion (E:T=10:1)

	Case	K562				Raji			
		Peripheral blood		Pleural effusion		Peripheral blood		Pleural effusion	
		Med <sup>a)</sup> /PPD <sup>b)</sup>	$\Delta\%$ <sup>c)</sup>	Med/PPD	$\Delta\%$	Med/PPD	$\Delta\%$	Med/PPD	$\Delta\%$
Carcinomatous pleurisy	1	26.0/55.8	29.8	2.8/ 8.1	5.3	2.7/ 4.0	1.3	0.3/ 1.9	1.6
	2	3.7/22.3	18.6	2.1/ 8.1	6.0	0.0/ 0.0	0.0	0.0/ 0.0	0.0
	3	64.8/79.7	14.9	12.7/18.6	5.9	19.6/28.2	8.6	4.9/ 5.4	0.5
	4	7.6/49.1	41.5	17.9/31.7	10.8	1.0/10.7	9.7	2.5/ 9.9	7.4
	5	4.8/23.3	18.5	2.7/ 9.3	6.6	0.0/ 0.7	0.7	0.2/ 0.3	0.1
	6	0.1/20.7	20.6	1.8/ 2.9	1.1	0.4/ 2.3	1.9	0.0/ 1.5	1.5
	7	23.0/55.8	32.8	2.7/16.9	14.2	16.4/28.8	12.4	0.0/ 4.1	4.1
	8	12.2/74.3	62.1	2.3/39.1	36.8	1.3/ 6.9	5.6	0.1/ 0.5	0.4
	9	14.7/41.0	26.3	25.0/53.0	28.0	1.6/ 8.9	7.3	2.2/14.3	12.1
	10	20.6/71.4	50.8	1.6/30.1	28.5	0.2/ 5.4	5.2	1.7/ 8.3	6.6
	11	8.0/21.0	13.0	3.0/11.4	8.4	1.1/ 1.7	0.6	0.0/ 2.6	2.6
	12	21.0/61.1	40.0	1.6/14.4	12.8	0.2/ 5.7	5.5	0.6/ 2.5	1.9
	13	12.7/18.8	6.1	1.1/ 4.5	3.4	0.2/ 0.2	0.0	0.0/ 0.0	0.0
	Mean±SD		28.8±15.5		13.1±10.7		4.5±4.0		3.0±3.5
Tuberculous pleurisy	1	7.2/55.9	48.7	6.6/38.1	31.5	0.8/24.9	24.1	6.6/21.3	14.7
	2	10.5/34.7	24.2	59.4/84.6	25.2	0.0/ 8.4	8.4	36.4/81.2	44.8
	3	2.8/ 9.5	6.7	1.6/15.5	13.9	0.0/ 0.0	0.0	0.0/ 0.0	0.0
	4	46.0/67.3	21.3	17.0/77.0	60.0	2.7/ 9.3	6.6	3.0/30.3	27.3
	5	41.9/78.4	36.5	5.8/34.3	28.5	2.1/38.4	36.3	2.6/18.3	15.7
	6	15.8/67.7	51.9	19.4/74.4	55.0	0.8/17.2	16.4	2.9/28.1	25.2
	7	11.1/44.0	32.9	0.0/ 8.2	8.2	0.2/12.0	11.8	1.6/ 4.2	2.6
	8	25.8/47.0	21.2	22.4/50.5	28.1	1.8/27.9	26.1	2.1/28.4	26.3
	9	19.6/52.9	33.3	1.6/34.1	32.5	1.2/ 6.6	5.4	1.9/ 5.5	3.6
	10	18.8/39.9	21.1	1.4/13.3	11.9	5.5/11.4	5.9	1.2/10.8	9.6
	11	23.6/66.6	43.0	33.9/79.3	45.4	1.6/31.2	29.6	1.0/24.2	23.2
	Mean±SD		31.0±13.6		30.9±16.9		15.5±11.8		17.5±13.4
Healthy control (N=17)			36.0±10.6		N. D. <sup>d)</sup>		16.5±11.3		N. D.

a): medium induced cytotoxicity (%)

b): PPD-induced cytotoxicity (%)

c): PPD-induced cytotoxicity (%) - medium induced cytotoxicity (%)

d): not done

したがって以後この条件で実験を行った。

癌性胸膜炎, 結核性胸膜炎, および健常者の単核球の PPD 添加による細胞傷害活性の結果を Table 1 に示す。Medium のみの培養でも僅かに細胞傷害活性を認めるが, 患者の末梢血, 胸水, および健常者末梢血いずれの場合にも PPD による細胞傷害活性の上昇が

認められた。そこで medium のみで認められた細胞傷害活性を back-ground とし, これと PPD 添加により誘導された細胞傷害活性の差 ( $\Delta$ cytotoxicity [%]) について検討した。

癌性胸膜炎において target cell を K562 とした場合, 細胞傷害活性は胸水では末梢血に比べ有意に低値

Table 2 Interleukin-2 production of mononuclear cells in cancer and tuberculosis patients with pleural effusion

	Case	Peripheral blood		Pleural effusion	
		Med <sup>a)</sup>	PPD <sup>b)</sup>	Med	PPD
Carcinomatous pleurisy	1	0	0	0	17
	2	0	2	0	12
	3	0	0	0	16
	4	0	0	0	6
	5	0	0	0	0
	6	0	4	0	20
	7	0	0	0	44
	8	0	0	0	0
	9	0	8	0	11
	10	0	0	0	8
	11	0	0	0	1
	12	0	28	0	60
	13	0	0	0	0
Mean±SD		0	3±8	0	15±17
Tuberculous pleurisy	1	0	7	0	49
	2	0	6	0	173
	3	0	0	0	7
	4	0	0	0	360
	5	0	1	0	24
	6	0	0	0	500
	7	0	0	0	13
	8	0	14	0	74
	9	0	0	0	50
	10	0	2	0	20
	11	0	30	0	434
Mean±SD		0	6±9	0	155±177
Healthy control (N=11)		0	18±25	0	N. D. c)

a) : medium alone production

b) : PPD-induced production (10<sup>-3</sup>U/ml)

c) : not done

を示した (p<0.01)。しかし、Raji を target cell とした場合、両者ともに低値を示し有意差を認めなかった。

一方、結核性胸膜炎における K562 および Raji に対する細胞傷害活性は胸水と末梢血の間にそれぞれ有意差を認めなかった。胸水単核球の細胞傷害活性は癌性胸水が結核性胸水に比較して有意に低値を示した。

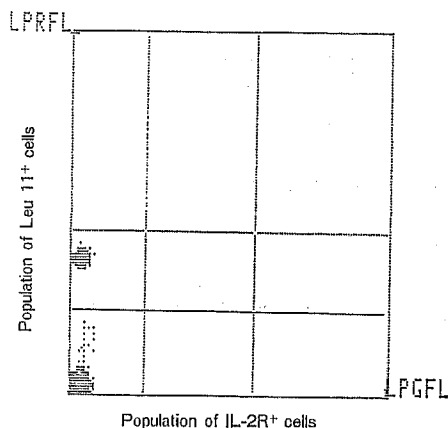


Fig. 3 IL-2R<sup>+</sup> cells on NK cells.

(K562 ; p<0.05, Raji ; p<0.01) 末梢血単核球の細胞傷害活性は癌性胸膜炎と結核性胸膜炎の間には target cell を K562 とした場合、有意差を認めなかったが、target cell を Raji とした場合、癌性胸膜炎では結核性胸膜炎および健常者に比較して有意に低値を示した (それぞれ p<0.05)。結核性胸膜炎と健常者の比較では両者間には有意差を認めなかった。

### B IL-2 産生能

癌性胸膜炎、結核性胸膜炎、および健常者、それぞれの単核球の PPD による IL-2 産生能を Table 2 に示す。

癌性胸膜炎において、胸水単核球の IL-2 産生能は末梢血に比べて有意に高値を示した (p<0.05)。結核性胸膜炎においても胸水単核球の IL-2 産生能は末梢血に比べて有意に高値を示した (p<0.05)。

癌性胸水単核球の IL-2 産生能は結核性胸水単核球に比較して、有意に低値を示した (p<0.05)。PPD 添加による末梢血単核球の IL-2 産生能は癌性胸膜炎、結核性胸膜炎、健常者の 3 者の間に有意差を認めなかった。

なお PPD 添加による癌性および結核性胸膜炎の末梢血、胸水の単核球の Leu-11 細胞上の IL-2 receptor はほとんど認められなかった。(Fig. 3)

### C LAK 活性

つぎに癌性および結核性胸膜炎例の末梢血および胸水の LAK 活性を測定するために、培養時間と濃度の基礎的検討を行った。健常者末梢血単核球の rIL-2 添加による細胞傷害活性の time-course を Fig. 4 およ

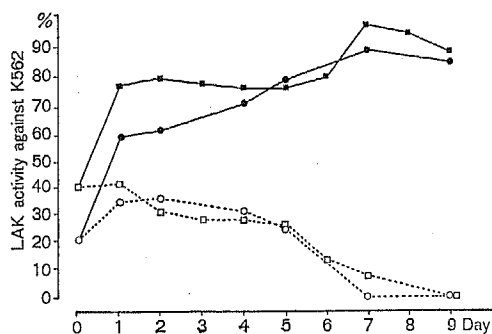


Fig. 4 Time course of LAK activity against K562. LAK activity was examined daily for nine days.

Case 1 ● LAK activity  
○ medium induced cytotoxicity  
Case 2 ■ LAK activity  
□ medium induced cytotoxicity

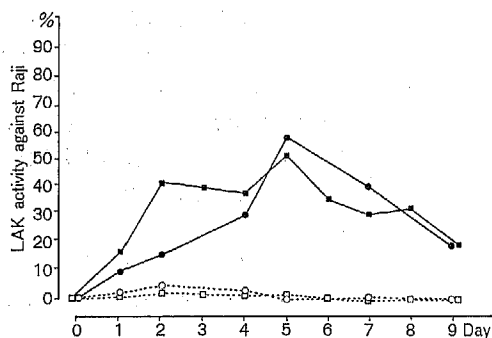


Fig. 5 Time course of LAK activity against Raji.

Case 1 ● PPD-induced cytotoxicity  
○ medium induced cytotoxicity  
Case 2 ■ PPD-induced cytotoxicity  
□ medium induced cytotoxicity

ぶ Fig. 5 に示した。細胞傷害活性は5～7日に最高値を示した。したがって培養時間を5日として以下の実験を行った。

つぎに rIL-2 添加による LAK 活性の dose-response について検討した。(Fig. 6, Fig. 7) その結果, rIL-2 の至適濃度は 2u/ml であり以下の実験をこの条件で行った。

つぎに癌性胸膜炎, 結核性胸膜炎, および健常者の LAK 活性を Table 3 に示した。Medium のみの培養により僅かな細胞傷害活性を認めるが, 癌および結核

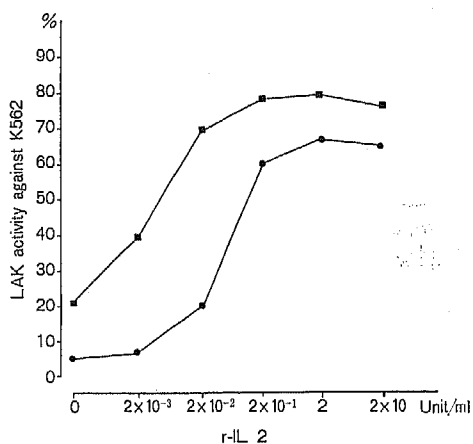


Fig. 6 Dose-response of LAK activity against K562.

LAK activity was examined at various concentrations of rIL-2.

● Case 1 ■ Case 2

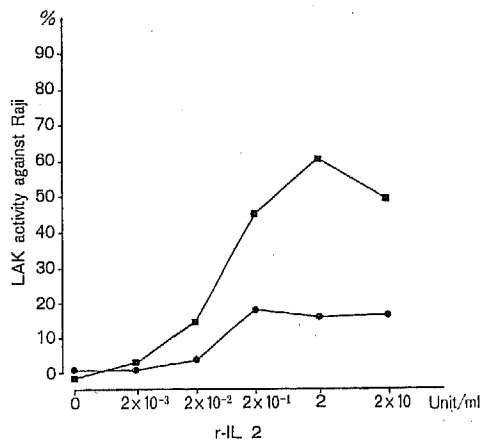


Fig. 7 Dose-response of LAK activity against Raji.

● Case 1 ■ Case 2

例の末梢血, 胸水, および健常者末梢血の単核球, いずれの場合にも rIL-2 添加による LAK 活性の上昇が認められる。そこで rIL-2 を添加した場合の LAK 活性と medium のみの細胞傷害活性の差 (Δ cytotoxicity [%]) について検討した。癌性胸膜炎の胸水単核球の K562 に対する LAK 活性は, 末梢血に比べて有意差を認めなかったが, Raji に対する LAK 活性は, 末梢血に比べて有意に低値を示した ( $p < 0.01$ )。結核

癌性および結核性胸膜炎における IL-2 産生能および LAK 活性の検討

Table 3 LAK activity against K 562 and Raji in cancer and tuberculosis patients with pleural effusion (E : T=10 : 1)

	Case	K562				Raji			
		Peripheral blood		Pleural effusion		Peripheral blood		Pleural effusion	
		Med <sup>a)</sup> /LAK <sup>b)</sup>	Δ% <sup>c)</sup>	Med/LAK	Δ%	Med/LAK	Δ%	Med/LAK	Δ%
Carcinomatous pleurisy	1	15.5/75.5	60.0	4.2/58.0	53.8	0.0/38.0	38.0	1.5/ 8.4	6.9
	2	0.6/59.6	59.0	29.3/63.5	34.2	0.0/17.6	17.6	8.6/29.6	21.0
	3	5.1/70.7	65.6	6.9/64.3	57.4	1.3/49.2	47.9	11.2/18.3	7.1
	4	21.2/84.1	62.9	8.8/67.5	58.7	1.3/38.3	37.0	2.6/21.8	19.2
	5	9.3/62.1	52.8	16.0/71.9	55.9	0.0/45.0	45.0	0.0/40.4	40.4
	6	3.8/87.9	84.1	3.7/19.4	15.7	0.0/50.3	50.3	0.0/ 0.7	0.7
	7	8.9/65.1	56.2	0.0/55.6	55.6	1.0/65.5	64.5	0.0/25.3	25.3
	8	5.9/67.0	61.1	4.2/54.9	50.7	0.0/15.5	15.5	2.8/ 8.9	6.1
	9	6.7/79.5	72.8	0.1/71.3	71.2	0.0/16.7	16.7	0.0/14.6	14.6
	Mean±SD		63.8±8.9		50.3±15.2		36.9±16.2		15.7±11.6
Tuberculous pleurisy	1	10.6/78.5	67.9	13.8/75.8	62.0	0.3/29.5	29.2	1.3/22.5	21.2
	2	14.5/58.5	44.0	2.5/60.5	58.0	0.5/ 9.9	9.4	1.5/16.2	14.7
	3	34.1/84.2	50.1	8.8/67.5	58.7	0.0/49.9	49.9	3.6/25.5	21.9
	4	17.2/58.4	41.2	38.0/72.1	34.1	0.0/20.4	20.4	5.1/48.6	43.5
	5	14.6/65.5	50.9	16.3/65.1	48.8	2.2/50.9	48.7	1.1/11.7	10.6
	6	18.1/58.0	39.9	19.1/56.2	37.1	0.8/35.1	34.3	9.8/25.4	15.6
	7	0.9/73.3	72.4	10.4/71.6	61.2	0.0/19.9	19.9	1.9/27.1	25.2
	8	20.8/63.9	43.1	6.9/70.1	63.2	0.6/19.7	19.1	0.9/21.8	20.9
	9	64.6/67.0	2.4	30.2/64.9	34.7	18.5/47.3	28.8	2.4/40.9	38.5
	Mean±SD		45.8±18.8		50.9±11.7		28.9±13.2		23.6±10.2
Healthy control (N=12)			61.0±14.5		N. D. <sup>d)</sup>		30.0±12.9		N. D.

a) : medium induced cytotoxicity (%)

b) : LAK activity (%)

c) : LAK activity (%) - medium induced cytotoxicity (%)

d) : not done

性胸水単核球の K562 および Raji に対する LAK 活性は、末梢血に比べて高値を示す場合と低値を示す場合の 2 群が認められるが、統計処理すると有意差を認めなかった。

末梢血単核球の LAK 活性は target が K562 および Raji の場合、癌性胸膜炎、結核性胸膜炎、健常者の 3 者間に有意差を認めなかった。胸水単核球の LAK 活性は癌性および結核性胸水の間には有意差を認めなかった。

#### IV 考 察

最近マウス、ヒトにおいて、biological response modifier (BRM) が NK 細胞に対して細胞傷害活性を増強することが報告されている<sup>10)-12)</sup>。われわれは

すでに胸水の結核菌陽性例では NK 活性が高値を示すことを報告した<sup>3)</sup>。このことは結核菌由来物質が NK 活性を増強している可能性を示している。そこで今回、結核菌由来の PPD を用いて癌性および結核性胸膜炎における免疫反応の相違につき検討した。

PPD 添加による細胞傷害活性は癌性および結核性胸膜炎の末梢血、胸水単核球のすべての例において増強された。癌性および結核性胸膜炎の末梢血単核球の K562 に対する細胞傷害活性は両者間に有意差を認めなかったが、Raji に対する細胞傷害活性は癌性胸膜炎の場合、有意に低値を示した。このことは NK 細胞に対する target cell の susceptibility の相違<sup>13)</sup>によると考えられる。すなわち chronic myeloid leukemia の由来の K562 は NK sensitive であり、Burki-

tt's lymphoma 由来の Raji は resistant のため、癌性胸膜炎の場合の細胞傷害活性低下が Raji でより明らかになったと考えられる。一方、癌性胸水中の単核球の K562 および Raji に対する PPD 添加による細胞傷害活性は結核性胸水に比較して低値を示した。このことは細胞傷害活性誘導における癌性胸水単核球の機能低下の存在を示している。さらに今回データは示さないが、モノクローナル抗体と補体を用いた方法より PPD により誘導される細胞傷害性細胞は Leu-11<sup>+</sup> 細胞であることと、以前報告したように癌性および結核性胸水中の NK (Leu-11) 細胞の陽性率が低値を示したこと<sup>3)</sup>から、この癌性胸水中の単核球の細胞傷害活性の機能低下は Leu-11<sup>+</sup> 細胞によることが強く示唆される。さらに癌性胸水中の単核球の PPD 添加による K562 に対する細胞傷害活性は、同末梢血の細胞傷害活性に比較して低値を示し、癌性胸膜炎の場合の胸腔内の細胞傷害活性の低下が明らかにされた。なお Raji に対する細胞傷害活性は両者とも低値を示し有意差を認めなかった。なお、今回の症例数を増やし検討した未治療例における結果においても、治療例を含む癌性および結核性胸膜炎における PPD による細胞傷害活性の結果<sup>14)</sup>と同傾向を示した。

つぎに PPD を添加した場合の末梢血、胸水単核球による NK 活性を増強される因子につき検討した。NK 活性を増強させる因子としては IL-2, interferon (IFN) が知られているが<sup>15)-20)</sup>、今回は、癌性および結核性胸膜炎の末梢血および胸水単核球における IL-2 産生能を検討した。

癌および結核の末梢血単核球の IL-2 産生能はそれぞれの胸水単核球の IL-2 産生能に比較して明らかに低値を示した。しかし PPD 添加による単核球の細胞傷害活性は癌では末梢血が胸水に比較して明らかに高値を示し、IL-2 産生と細胞傷害活性とは必ずしも相関を認めなかった。同様の結果は結核においても認められた。すなわち胸水単核球の IL-2 産生は末梢血に比較して明らかに高値を示したが、細胞傷害活性の結果は末梢血と胸水の間に有意差を認めなかった。これらの結果は、IFN 産生と細胞傷害活性は相関を認めない<sup>14)</sup>——という結果と同様であった。これらの原因としては、IFN と IL-2 以外の因子、すなわち PPD 添加による NK 細胞と target cell の conjugate および conjugate 後における cytolysis の増加<sup>21)</sup>、健常者単核球より産生される IL-2 と異なる NK 活性増強因子の存在<sup>22)</sup>あるいは癌性胸水中の抑制性細胞に

よる細胞傷害性細胞の抑制<sup>23)</sup>、さらに PPD 添加による IL-2 receptor の発現および細胞傷害活性を有する細胞の増殖による細胞傷害活性の増加、等が考えられるが、今回施行した単核球の18時間培養では NK 細胞上の IL-2 receptor は認められないこと、および今回データを示さないが、培養後の Leu-11<sup>+</sup> 細胞の増加が認められないことより、この IL-2 receptor 発現および細胞傷害活性を有する細胞の増殖の可能性は考えにくいと思われる。

つぎに癌性胸水単核球の細胞傷害活性機能をより明らかにするために、癌性および結核性胸膜炎の末梢血胸水単核球に IL-2 を添加することにより誘導される LAK 活性を検討した。癌性胸水単核球の LAK 活性は Raji を target とした場合、同疾患末梢血単核球の LAK 活性に比較して低値を示し、癌性胸水単核球の細胞傷害活性の低下が明らかとなった。今回、癌および結核例においてこのような結果が得られた原因としては、LAK 細胞の前駆細胞の胸腔内への移動による減少、LAK 前駆細胞の減少および LAK 細胞の誘導を抑制する細胞の存在、等が考えられる。さらに、最近マウスおよびヒトにおいて LAK 細胞の前駆細胞は種々の細胞マーカー [マウス: Thy-1, Lyt-2, ヒト: Leu-11 (CD-16), T-11 (CD-2), B-1 (CD-20), Leu-3a (CD-4), Leu-2a (CD-8) 等] を有すること、すなわち LAK 細胞の heterogeneity が報告されており<sup>24)-28)</sup>。これらの細胞群の population の変化が LAK 活性に影響を与えることが考えられる。

一方、結核性胸水の LAK 活性は高値群と低値群の2群に分かれた。われわれはすでに結核性胸水 NK 活性<sup>3)</sup>についても高値群と低値群を示すという同様な傾向を認めている。この理由としては、結核の病期による細胞の活性化による影響、IL-2 receptor の出現時期およびその量的変化等の関与が考えられるが原因は不明である。

以上の結果から癌性胸水中の単核球の細胞障害活性が低値を示す原因として、リンパ球の effector 機構の障害ばかりでなく、IL-2 に対するリンパ球の effector 機構の障害が存在することが示された。今回の PPD による解析の結果、胸水単核球により IL-2 の産生が認められるにもかかわらず細胞傷害活性は低値を示し、さらに多量の exogenous IL-2 を投与しても細胞傷害活性が高値を示さなかったことより、IL-2 単独投与では臨床的に有効な効果が得られないことが考えられ、他の治療法との combination の必要性が



示唆された。今後さらに新しい combination therapy を検討してゆく予定である。

## V 結 語

- 1) 癌性および結核性胸水中の単核球の IL-2 産生能はそれぞれの末梢血の単核球に比較して高値を示した。
- 2) 結核性胸水中の単核球の IL-2 産生能は癌性胸水中の単核球の IL-2 産生能に比較して高値を示した。
- 3) 癌性胸水の LAK 活性は、特に Raji を target cell とした場合、同疾患の末梢血の LAK 活性に比較して低値を示し、一方、結核性胸水の LAK 活性は末梢血の LAK 活性に比較して高値あるいは低値を示す 2 群となった。
- 4) 癌性胸水の LAK 活性は、IL-2 産生能の増加

にもかかわらず低下を示し、臨床医学への応用としては、癌性胸膜炎への IL-2 単独投与よりも、他の治療法との combination の必要性が示唆された。

本研究の要旨の一部は、第27回胸部疾患学会総会（1987年4月東京）および第15回臨床免疫学会総会（1987年7月札幌）に発表した。さらに第8回ヨーロッパ免疫学会（1987年9月Zagreb）に発表した。

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲を賜りました当教室の草間昌三教授に深甚なる謝意を表します。同時に本研究に際し、御教示御指導くださいました大久保喜雄博士ならびに免疫グループをはじめとする教室の諸兄に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Okubo, Y., Kusama, S. and Yano, A. : PPD-specific proliferative response in humans. 1. Analysis of PPD-specific proliferative cells from tuberculous pleurisy patients and healthy controls with monoclonal antibodies specific for human T subsets. *Microbiol Immunol*, 26 : 511-521, 1982
- 2) 大久保喜雄, 中田真佐雄, 北沢邦彦, 和田茂比古, 草間昌三 : 結核性胸膜炎, 肺結核におけるリンパ球表面抗原の解析とリンパ球増殖反応. *信州医誌*, 35 : 155-159, 1986
- 3) Okubo, Y., Nakata, M., Kuroiwa, Y., Wada, S. and Kusama, S. : Phenotypic and functional study of natural killer cells in tuberculous pleurisy patients. *Jpn J Med*, 25 : 250-256, 1986
- 4) Lotz, M. T., Grimm, E. A., Muzumder, A., Strausser, J. L. and Rosemberg, S. A. : Lysis of fresh and cultured autologous tumor by human lymphocytes cultured in T-cell growth factor. *Cancer Res*, 41 : 4420-4425, 1981
- 5) Grimm, E. A., Munzumder, A., Zhang, H. Z. and Rosemberg, S. A. : Lymphokine-activated killer cell phenomenon : lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin-2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med*, 155 : 1823-1841, 1982
- 6) Rosenstein, M., Yron, I., Kaufmann, Y. and Rosemberg, S. A. : Lymphokine-activated killer cells : lysis of fresh syngeneic natural killer-resistant murine tumor cells by lymphocytes cultured in interleukin 2. *Cancer Res*, 44 : 1946-1953, 1984
- 7) Mule, J. J., Yang, J., Shu, S. and Rosemberg, S. A. : The anti-tumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 *in vivo* : Direct correlation between reduction of established metastasis and cytolytic activity of lymphokine-activated killer cells. *J Immunol*, 136 : 3899-3909, 1986
- 8) Jurius, M. H., Simpton, E. and Herzenberg, L. A. : A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur J Immunol*, 3 : 645-649, 1973
- 9) Farrar, J. J., Benjamin, W. R., Hilfiker, M. L., Howard, M., Farrar, W. L. and Fuller-Farrar, J. : The biochemistry, biology, and role of interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. *Immunol Rev*, 63 : 129-166, 1982
- 10) Wolfe, S. A., Tracey, D. E. and Henney, C. S. : Induction of "natural killer" cells by BCG. *Nature*, 262 : 584-586, 1976

- 11) Wiltrout, R.H., Mathieson, B. J., Talmadge, J.E., Reynolds, C.W., Zhang, S.R. and Herberman, R.B. : Augmentation of organ-associated natural killer activity by biological response modifiers. Isolation and characterization of large granular lymphocytes from the liver. *J Exp Med*, 160 : 1431-1449, 1984
- 12) Kalland, T., Alm, G. and Stalhandske, T. : Augmentation of mouse natural killer cell activity by LS 2616, a new immunomodulator, *J Immunol*, 134 : 3956-3961, 1985
- 13) Storkus, W. J., Howell, D.N., Salter, R.D., Dawson, J.R. and Cresswell, P. : NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J Immunol*, 138 : 1657-1659, 1987
- 14) 中田真佐雄 : 癌性胸膜炎, 結核性胸膜炎における末梢血および胸腔内の免疫学的検討—NK 細胞の表面抗原および機能的解析—. *信州医誌*, 35 : 309-320, 1987
- 15) Henney, C.S., Kuribayashi, K., Kern, D.E. and Gillis, S. : Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature*, 291 : 335-338, 1981
- 16) Douglas, A.W., Stanton, G.J. and Johnson, H.M. : Interleukin 2 enhances natural killer cell activity through induction of gamma interferon. *Infect Immun*, 41 : 992-997, 1983
- 17) Domzig, W., Stadler, B.M. and Herberman, R.B. : Interleukin 2 dependence of human natural killer cell activity. *J Immunol*, 130 : 1970-1973, 1983
- 18) Einhorn, S., Blomgren, H. and Strander, H. : Interferon and spontaneous cytotoxicity in man. I. Enhancement of the spontaneous cytotoxicity of peripheral lymphocytes by human leukocyte interferon. *Int J Cancer*, 22 : 405-412, 1978
- 19) Targan, S.R. and Dorey, F. : Interferon activation of "prespontaneous killer" (pre-SK) cells and lateration in kinetics of lysis of both "pre-SK" and active SK cells. *J Immunol*, 125 : 2157-2161, 1980
- 20) Kuribayashi, K., Gillis, S., Kern, D.E. and Henney, C.S. : NK cell cultures ; effects of interleukin 2 and interferon on cell growth and cytotoxic reactivity. *J Immunol*, 126 : 2321-2327, 1981
- 21) Sibbitt, W. Jr, Bankhurst, A.D., Jumonville, A.J., Sakai, J.H., Saiers, J.H. and Doberneck, R.C. : Defects in natural killer cell activity and interferon response in human lung carcinoma and malignant melanoma. *Cancer Res*, 44 : 852-856, 1984
- 22) Bloom, E.T., Babbitt, J.T. and Kawakami, K. : Monocyte-mediated augmentation of human natural killer cell activity : conditions, monocyte and effector cell characteristics. *J Immunol* 137 : 172-178, 1986
- 23) Uchida, A. and Micksche, M. : Suppressor cells for natural killer activity in carcinomatous pleural effusions of cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*, 11 : 255-263, 1981
- 24) Itoh, K., Tilden, A.B., Kumagai, K. and Balch, C.M. : Leu-11<sup>+</sup> lymphocytes with natural killer (NK) activity are precursors of recombinant interleukin 2 (rIL-2)-induced activated killer (AK) cells. *J Immunol*, 134 : 802-807, 1985
- 25) Damle, N.K., Doyle, L.V. and Bradley, E.C. : Interleukin 2-activated human killer cells are derived from phenotypically heterogeneous precursors. *J Immunol*, 137 : 2814-2822, 1986
- 26) Tilden, A.B., Itoh, K. and Balch, C.M. : Human lymphokine-activated killer (LAK) cells : Identification of two types of effector cells. *J Immunol*, 138 : 1068-1073, 1987
- 27) Ferrini, S.F., Miescher, S., Zocchi, M.R., Flieder, V. and Moretta, A. : Phenotypic and functional characterization of recombinant interleukin 2 (rIL 2)-induced activated killer cells : Analysis at the population and clonal levels, *J Immunol*, 138 : 1297-1302, 1987
- 28) Ballas, Z.K., Rasmussen, W. and van Otegham, J.K. : Lymphokine-activated killer (LAK) cells. II. Delineation of distinct murine LAK-precursor subpopulations. *J Immunol*, 138 : 1647-1652, 1987

(62. 6. 30 受稿)