

癌性胸膜炎, 結核性胸膜炎における末梢血 および胸水の免疫学的検討

—NK細胞の表面抗原および機能的解析—

中 田 真 佐 雄

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 Peripheral Blood and Pleural Effusion in Patients with Carcinomatous and Tuberculous Pleurisy

—Phenotypical and Functional Analyses of Natural Killer Cells—

Masao NAKATA

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

In order to better understand the immunobiological difference between peripheral blood and pleural effusion, phenotypical and functional analyses of natural killer (NK) cells were examined in 17 patients with carcinomatous pleurisy and 28 patients with tuberculous pleurisy.

Leu 7+ and Leu 11+ cell populations in carcinomatous and tuberculous pleural effusion were lower than those of peripheral blood, respectively. NK activity in carcinomatous pleural effusion was lower than that of peripheral blood. In contrast, NK activity in tuberculous pleural effusion varied widely and was found to be high in some patients with *Mycobacterium tuberculosis* detected in the pleural effusion. The mechanism of this high NK activity was investigated by using purified protein derivative (PPD). The PPD-induced cytotoxicity in tuberculous pleural effusion was much higher than that in carcinomatous pleural effusion. Further, the lower cytotoxic function in the patients with carcinomatous pleurisy may be related to the low production of interferon (IFN) and low response to IFN of carcinomatous pleural effusion cells. These data would be useful for the differential diagnosis between carcinomatous and tuberculous pleurisy. *Shinshu Med. J.*, 35 : 309—320, 1987

(Received for publication January 5, 1987)

Key words : carcinomatous pleurisy, tuberculous pleurisy, local immunity, natural killer cells

癌性胸膜炎, 結核性胸膜炎, 局所免疫能, NK細胞

I 緒 言

Natural killer (NK) 細胞は, 免疫されてない個体において, ある種の腫瘍細胞を *in vitro* にて障害する細胞群であると報告されている¹⁾。NK細胞は *in*

vivo において, 腫瘍の発生, 増殖および進展や, ウイルス感染に対し, さらには, ある種の細菌感染に対しても生体の防御的作用を有している可能性が示唆されている²⁾³⁾。ヒトNK細胞は, 形態学的にはレンズ形の核とアズール顆粒を持つ大顆粒リンパ球に属し, 表

面形質として Fc receptor を有していることが知られている⁴⁾。さらに、近年 NK 細胞に特異性の高い monoclonal 抗体の作成に加え、flow cytometry の開発により、NK 細胞の特性が次第に明らかにされつつある⁵⁾⁶⁾。これら基礎免疫学の研究成果は臨床にも応用され、呼吸器疾患領域において、種々の疾患の末梢血につき NK 細胞の検討が行われている⁷⁾⁸⁾。しかし、病変局所における NK 細胞の免疫生物学的活性については不明の点が多い。著者は胸腔内局所の免疫学的研究を胸水貯留疾患において行い、その免疫学的相違を末梢血と比較し検討してきた⁹⁾⁻¹²⁾。今回、胸水貯留疾患として高頻度で、その鑑別診断に苦慮する場合が少なくない癌性胸膜炎および結核性胸膜炎の末梢血、胸水中の NK 細胞につき、表面抗原の解析、NK 活性、さらに精製ツベルクリン (PPD) 添加による細胞障害活性の増強効果 および interferon (IFN) 産生能を測定し、両疾患における免疫学的相違を比較検討した。

II 対象および方法

A 対象

対象は、信州大学第1内科および関連病院に入院した癌性胸膜炎17例（男性10例，女性7例，年齢34～84歳，平均年齢53.6±10.2）であり，その内訳は，原発性肺癌15例（腺癌12例，扁平上皮癌2例，大細胞癌1例），転移性癌2例（喉頭癌1例，Grawitz 腫瘍1例）であった。結核性胸膜炎は28例（男性22例，女性6例，年齢24～83歳，平均年齢56.8±15.0）であった。癌性胸膜炎は胸水細胞診，喀痰細胞診，気管支鏡下の擦過細胞診，生検組織診または剖検により診断した。結核性胸膜炎の診断は，胸水または喀痰からの結核菌の検出および臨床経過により行った。なお，癌性胸膜炎では1例，結核性胸膜炎では2例を除き，すべて治療前に検討した。対照は，健常者30名であり，年齢を癌性および結核性胸膜炎例にほぼ合わせた（男性18例，女性12例，年齢23～79歳，平均年齢50.8±15.5）。

B 単核球の分離

単核球の分離方法は以前の報告と同様である⁹⁾。略述すると，対象患者および健常者より heparin 加末梢血 20-30ml を採取し，RPMI-1640 (GIBCO, Grand Island, U. S. A.) により 2-3 倍に希釈後，Lymphoprep (Nyegaard Co., Norway) に重層し，400G で 30 分間遠心後単核球層を採取し，その後 RPMI-1640 で 3 回洗浄した。一方，末梢血と同時に採取した癌性

および結核性胸膜炎の heparin 加胸水 (50-500ml) は，300G で 10 分間遠心後，細胞成分を RPMI-1640 に浮遊した。結核性胸水は，Lymphoprep に重層し，400G で 30 分間遠心後単核球層を採取した。癌性胸水は，腫瘍細胞を除去する目的で，100% Lymphoprep および 75% Lymphoprep に細胞成分を重層し遠心後，100% Lymphoprep の液面層より単核球を採取した。なお，腫瘍細胞の除去が不十分の場合，nylon-wool column¹³⁾ を用いることにより，腫瘍細胞の混入率は 1% 以下となった。得られた単核球を 10% 非働化 fetal calf serum (FCS) および streptomycin (100μg/ml)，penicillin (100U/ml) を添加した RPMI-1640 (complete medium) に浮遊した。

C リンパ球表面抗原の解析

リンパ球表面抗原の解析は各種 monoclonal 抗体を用いて flow cytometry (EPICS V, Coulter Co., U. S. A.) により解析した。FITC 標識 monoclonal 抗体 (Becton Dickinson, U. S. A.) は，抗 Leu 7 抗体，抗 Leu 11 抗体を用いた。末梢血および胸水単核球 (2×10^6) を 1% 非働化 FCS を添加した phosphate buffered saline (PBS) (100μl) に浮遊し，0.1% NaN_3 存在下で，各種 monoclonal 抗体 5-20μl と，4°C，暗所にて 30 分間反応させた。各単核球を 1% FCS 添加の PBS により 2 回洗浄し，最終的に 500-1000μl の 1% FCS を添加した PBS に浮遊した。リンパ球表面抗原の解析は，flow cytometry を用いて，forward scatter および 90° scatter によりリンパ球集団に gate を設定し，これらの細胞群 1×10^4 を測定し，fluorescence 陽性細胞 (%) を算出した。

D 細胞障害活性試験

細胞障害活性は，4 時間の ^{51}Cr release assay により算定した。Effector 細胞は，分離直後および培養後の末梢血，胸水単核球であり，target 細胞としては K562 および Raji を用いた。 ^{51}Cr の labeling は，target 細胞約 5×10^6 に対し， $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (NEN. Co., U. S. A.) を 50-100μCi 添加し，37°C，5% CO_2 存在下で 60-90 分間培養して行った。単核球 1×10^6 に対し，target 細胞 1×10^4 を microtest plate (U-type, Nunc Co., Denmark) の各 well に分注し，effector と target の比を 10:1 (E:T=10:1) とした。総量を complete medium にて 200μl にした後，100G で 5 分間遠心後，37°C，5% CO_2 存在下で 4 時間培養した。培養終了後，microtest plate を 100G で 10 分間遠心し，上清を 100μl 採取し，放射能活

性を gamma counter (Packard Co., U.S.A.) で測定した。各検体は, quadruplicate で行い, 細胞障害活性 (%) は次式: $(\text{experimental } ^{51}\text{Cr release} - \text{spontaneous } ^{51}\text{Cr release}) / (\text{maximum } ^{51}\text{Cr release} - \text{spontaneous } ^{51}\text{Cr release}) \times 100 (\%)$ にて算出した。

E 細胞培養

末梢血および胸水単核球 1ml (2×10^6) を PPD (日本 BCG Co., Tokyo) 12.5 μ g 添加群と非添加群にわけ円錐 tube (Falcon #2095, U.S.A.) に分注し, 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。培養至適条件は, あらかじめ健常者末梢血単核球の K562 および Raji に対する細胞障害活性の time course を検討し, その結果, 至適時間は 18 時間であったので, 以後の実験はこの条件で行った。18 時間の培養終了後に 300G で 10 分間遠心し, 細胞成分は PPD に誘導される細胞障害活性の測定に使用し, 一方培養上清は, PPD 添加による IFN 産生能測定のために採取し -80°C にて保存した。なお, PPD に誘導される細胞障害活性 (4% cytotoxicity) は, PPD 添加群の細胞障害活性 (%) と, PPD

非添加群の細胞障害活性 (%) の差として算出した。

F Interferon (IFN) 産生能

末梢血, 胸水単核球の PPD 添加および非添加培養によって得られた上清の IFN 力価 (IU/ml) を, Sindbis virus を用いた dye uptake test¹⁴⁾ により測定した。

G 統計解析

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

III 結 果

A リンパ球表面抗原の解析

1 Leu 7+細胞

健常者の末梢血, 癌性胸膜炎および結核性胸膜炎における末梢血, 胸水中の Leu 7+ 細胞 (%) の結果 (mean \pm SD) を Fig. 1 に示した。

癌性胸膜炎の末梢血および胸水は, それぞれ 23.0 \pm 13.3, 11.2 \pm 10.6 であり, 結核性胸膜炎の末梢血および胸水は, それぞれ 28.2 \pm 13.0, 5.9 \pm 4.7 であった。なお, 健常者の末梢血は 23.8 \pm 9.2 であった。

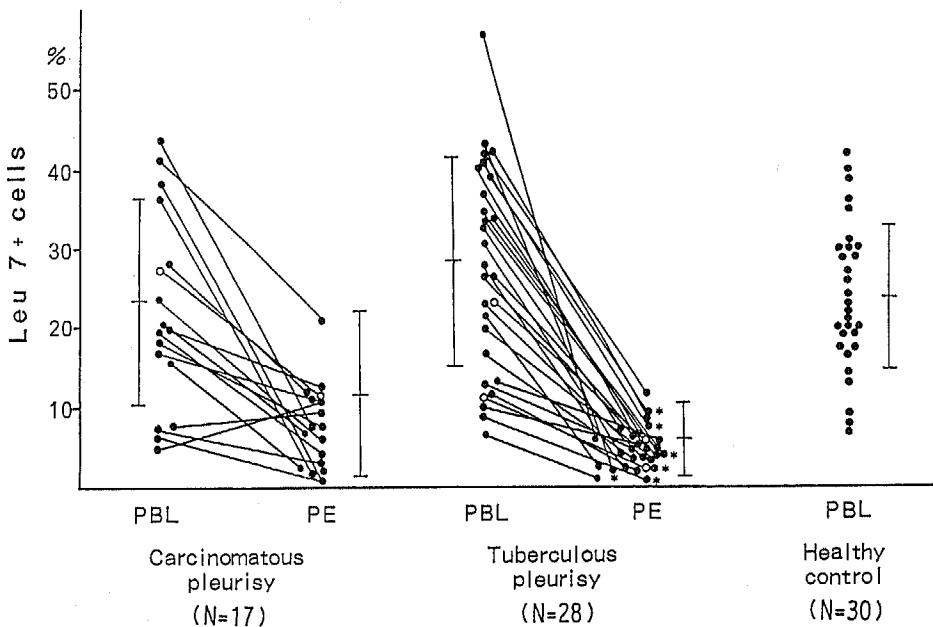


Fig. 1 Proportion of Leu 7+ cells

● : before treatment PBL : peripheral blood
 ○ : after treatment PE : pleural effusion
 * : *Mycobacterium tuberculosis* positive

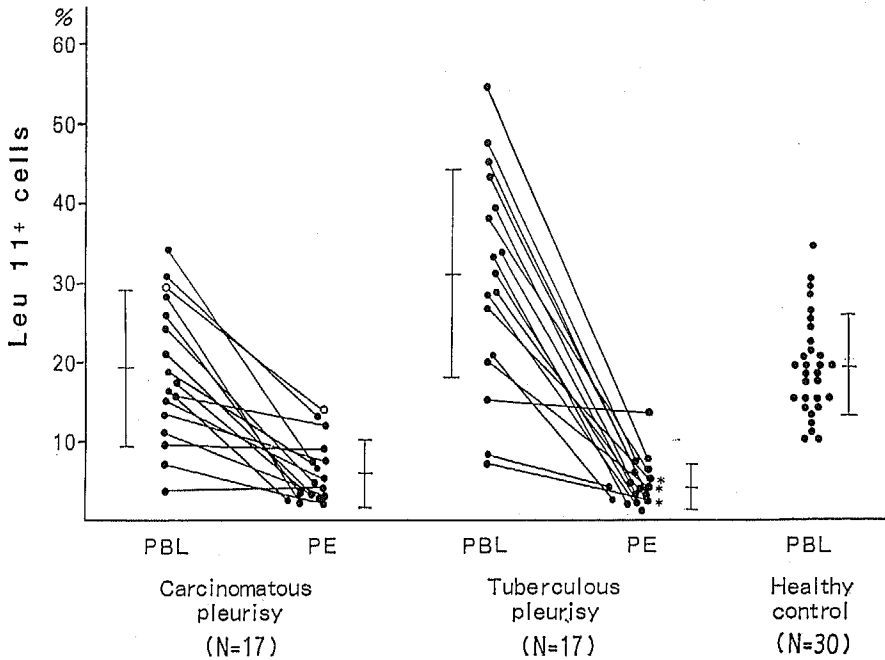


Fig. 2 Proportion of Leu 11+ cells

● ○ * : See figure legend in Fig. 1

a 末梢血の比較

健常者、癌性胸膜炎および結核性胸膜炎の末梢血につき比較検討すると、Leu 7+ 細胞は、3者間に有意差を認めなかった。

b 各疾患における末梢血と胸水の比較

癌性胸膜炎および結核性胸膜炎の胸水中 Leu 7+ 細胞は、おのこのの末梢血に比較し有意（それぞれ $p < 0.001$, $p < 0.001$ ）に低値を示した。

c 両疾患における胸水の比較

結核性胸膜炎の胸水中 Leu 7+ 細胞は、癌性胸膜炎に比較し有意（ $p < 0.05$ ）に低値を示した。

2 Leu 11+細胞

健常者の末梢血、癌性胸膜炎および結核性胸膜炎における末梢血、胸水中の Leu 11+ 細胞（%）の結果（mean±SD）を Fig. 2 に示した。

癌性胸膜炎の末梢血および胸水は、それぞれ19.3±10.4, 6.3±4.1であり、結核性胸膜炎の末梢血および胸水は、それぞれ30.4±13.7, 4.0±2.8であった。なお、健常者の末梢血は19.0±6.1であった。

a 末梢血の比較

結核性胸膜炎の末梢血 Leu 11+細胞は、癌性胸膜炎および健常者に比較し有意（それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.001$ ）に高値を示した。

b 各疾患における末梢血と胸水の比較

癌性胸膜炎および結核性胸膜炎の胸水中 Leu 11+ 細胞は、おのこのの末梢血に比較し有意（それぞれ $p < 0.001$, $p < 0.001$ ）に低値を示した。

c 両疾患における胸水の比較

胸水中 Leu 11+細胞は癌性胸膜炎と結核性胸膜炎との間に有意差を認めなかった。

B NK 活性

1 K562に対する細胞障害活性

健常者の末梢血、癌性胸膜炎と結核性胸膜炎の末梢血および胸水単核球の K562 に対する細胞障害活性（NK 活性）（%）の結果（mean±SD）を Fig. 3 に示した。

癌性胸膜炎の末梢血および胸水は、それぞれ16.0±12.8, 7.8±9.2であり、結核性胸膜炎の末梢血および胸水はそれぞれ19.6±13.6, 21.7±19.4であった。なお健常者の末梢血は17.6±12.1であった。

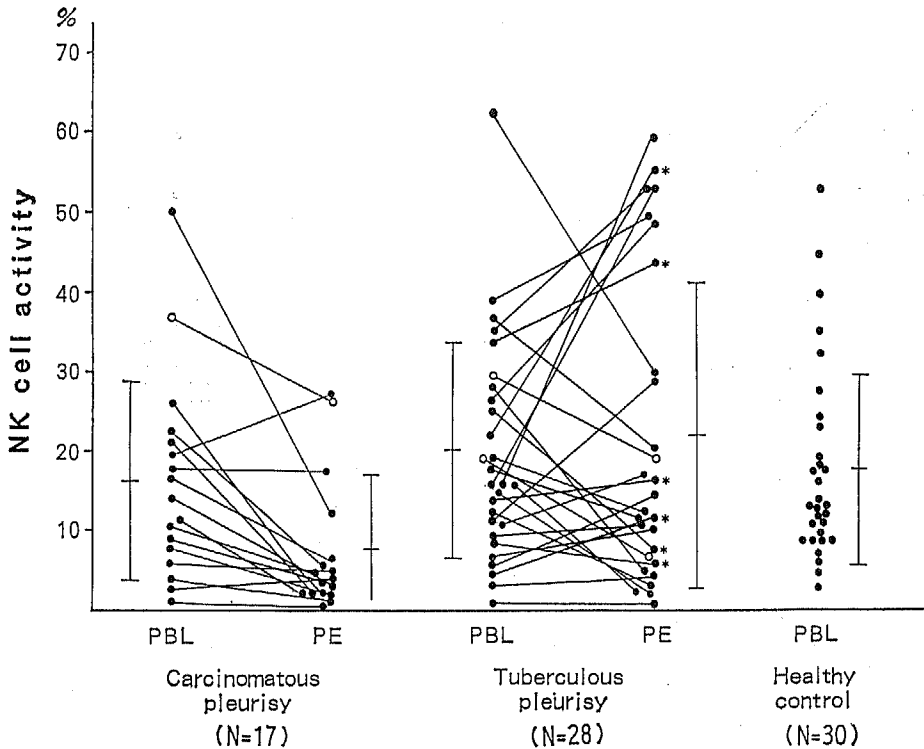


Fig. 3 NK cell activity against K562 (E : T=10 : 1)

● : before treatment PBL : peripheral blood
○ : after treatment PE : pleural effusion
* : *Mycobacterium tuberculosis* positive

a 末梢血の比較

癌性胸膜炎，結核性胸膜炎および健常者の末梢血のNK活性は，3者間に有意差を認めなかった。

b 各疾患における末梢血と胸水の比較

癌性胸膜炎における末梢血と胸水のNK活性を同一症例につき検討すると，17例中15例において胸水の細胞障害活性が末梢血に比較し低値を示した。なお，OK-432投与中の1例は末梢血，胸水ともに高い活性を有していた。癌性胸膜炎17例の末梢血と胸水を検討すると，胸水では末梢血に比較し有意 ($p < 0.05$) に低値を示した。

つぎに結核性胸膜炎において末梢血と胸水のNK活性を同一症例につき検討すると，胸水のNK活性が末梢血に比較し明らかに高値を示す例，末梢血と同程度の活性を示す例，および末梢血に比較し低値を示す例が認められた。なお，胸水中より結核菌が認められた

胸水のNK活性は，高値を示す例と低値を示す例があり，一定の傾向を認めなかった。治療中 (SM, INH, RFP) の2例は，ともに胸水のNK活性が末梢血に比較し低値を示していた。結核性胸膜炎28例の末梢血と胸水を比較すると両者間に有意差を認めなかった。

c 両疾患における胸水の比較

癌性胸膜炎および結核性胸膜炎の胸水を検討すると，癌性胸膜炎では結核性胸膜炎に比較し有意 ($p < 0.01$) に低値を示した。

なお data は示してないが，effector と target の比を，30 : 1 と変えて検討したが，同様の結果を得た。

2 Raji に対する細胞障害活性

Raji に対する細胞障害活性 (%) の結果 (mean \pm SD) を Fig. 4 に示した。

癌性胸膜炎の末梢血および胸水は，それぞれ 4.0 ± 5.9 ， 3.9 ± 5.5 であり，結核性胸膜炎の末梢血および

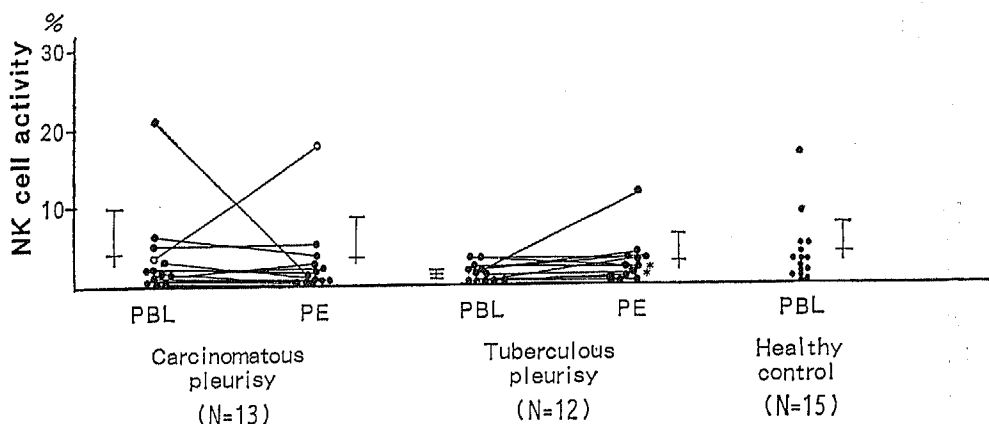


Fig. 4 NK cell activity against Raji (E : T=10 : 1)

● ○ * : See figure legend in Fig. 3

胸水は、それぞれ 1.3 ± 1.1 , 3.0 ± 3.3 であった。なお、健常者の末梢血は 3.8 ± 3.9 であった。Raji に対する細胞障害活性は、target 細胞を K562 とした場合に比較し、いずれの群も低値を示していた。なお、OK-432 投与例における胸水の細胞障害活性は、未治療群に比較し高値を示した。

C PPD に誘導される細胞障害活性

1 PPD に誘導される K562 に対する細胞障害活性
癌性胸膜炎、結核性胸膜炎および健常者の PPD に誘導される K562 に対する細胞障害活性の結果を Table 1 に示す。

a 末梢血の比較

癌性胸膜炎、結核性胸膜炎および健常者における末梢血の 4% cytotoxicity (mean±SD) は、3 者間に有意差を認めなかった。

b 各疾患における末梢血と胸水の比較

癌性胸膜炎において、末梢血および胸水単核球の K562 に対する細胞傷害活性は、PPD 添加によりすべての例で増強された。同一症例において末梢血と胸水と比較すると、胸水の 4% cytotoxicity は、12 例中 10 例において末梢血に比較し低値を示していた。なお、OK-432 投与例は、PPD 添加、非添加とも高い細胞障害活性を示した。癌性胸膜炎 12 例につき末梢血と胸水の 4% cytotoxicity を検討すると、胸水は末梢血に比較し有意 ($p < 0.05$) に低値を示した。

一方、結核性胸膜炎の同一症例につき末梢血および胸水の増強効果を検討すると、胸水の 4% cytotoxicity

city が、case 3, 11 のように末梢血と同程度の例、case 4, 6 のように胸水が末梢血より高値を示す例を認めた。結核性胸膜炎 11 例につき末梢血と胸水の 4% cytotoxicity を比較すると、両者間に有意差を認めなかった。

c 両疾患における胸水の比較

癌性胸膜炎の胸水においては PPD 添加により著しい細胞障害活性の増強は認められず、癌性胸水における 4% cytotoxicity は、結核性胸水に比較し有意 ($p < 0.05$) に低値を示した。

2 PPD に誘導される Raji に対する細胞障害活性
癌性胸膜炎、結核性胸膜炎および健常者の PPD に誘導される Raji に対する細胞障害活性の結果を、Table 2 に示す。

a 末梢血の比較

癌性胸膜炎における末梢血の 4% cytotoxicity (mean±SD) は、結核性胸膜炎および健常者に比較し有意 (それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.001$) に低値を示した。

b 各疾患における末梢血と胸水の比較

癌性胸膜炎における末梢血および胸水単核球の Raji に対する細胞障害活性は、PPD 添加により 12 例中 11 例において軽度増強された。また同一症例について検討すると、12 例中 7 例は胸水の 4% cytotoxicity が末梢血に比較し低値を示していたが、case 2 のように末梢血および胸水ともにまったく反応を示さない例、case 3 (OK-432 投与例) のように胸水の 4%

Table 1 PPD-induced cytotoxicity against K562 (E:T=10:1)

	Peripheral blood				Pleural effusion		
	Case	Med(%) ^{a)}	PPD(%) ^{b)}	Δ % ^{c)}	Med(%)	PPD(%)	Δ %
Carcinomatous pleurisy	1	26.0	55.8	29.8	2.8	8.1	5.3
	2	3.7	22.3	18.6	2.1	8.1	6.0
	3*	42.6	43.6	1.0	68.3	76.4	8.1
	4	64.8	79.7	14.9	12.7	18.6	5.9
	5	7.6	49.1	41.5	17.9	31.7	13.8
	6	4.8	23.3	18.5	2.7	9.3	6.6
	7	0.1	20.7	20.6	1.8	2.9	1.1
	8	23.0	55.8	32.8	2.7	16.9	14.2
	9	12.2	74.3	62.1	2.3	39.1	36.8
	10	14.7	41.0	26.3	25.0	53.0	28.0
	11	20.6	75.4	54.8	1.6	30.1	28.5
	12	8.0	21.0	13.0	3.0	11.4	8.4
	Mean±SD			27.8±17.7			13.6±11.3
Tuberculous pleurisy	1	7.2	55.9	48.7	6.6	38.1	31.5
	2**	17.2	66.3	49.1	11.4	38.0	26.6
	3	10.5	34.7	24.2	59.4	84.6	25.2
	4	2.8	9.5	6.7	1.6	15.5	13.9
	5**	15.3	34.3	19.0	1.2	15.9	14.7
	6	46.0	67.3	21.3	17.0	77.0	60.0
	7	41.9	78.4	36.5	5.8	34.3	28.5
	8	ND ^{d)}	ND	ND	5.2	41.7	36.5
	9	11.1	44.0	32.9	0	8.2	8.2
	10	25.8	47.0	21.2	22.4	50.5	28.1
	11	19.6	52.9	33.3	1.6	34.1	32.5
	12	18.8	39.9	21.1	1.4	13.3	11.9
	Mean±SD			28.5±13.0			26.5±13.9
Healthy control (N=10)	Mean±SD			38.2±10.2	ND	ND	

a): medium induced cytotoxicity (%) b): PPD-induced cytotoxicity (%)
 c): PPD-induced cytotoxicity (%) - medium induced cytotoxicity (%) d): not done
 * : treatment with OK-432 ** : *Mycobacterium tuberculosis* positive

cytotoxicity が末梢血に比較し高値を示す例が 2 例認められた。癌性胸膜炎12例につき末梢血と胸水の Δ % cytotoxicity を比較すると、両者間に有意差を認めなかった。

つぎに結核性胸膜炎の末梢血と胸水における細胞障害活性を検討すると、末梢血および胸水単核球は 1 例を除くすべての例で細胞障害活性が明らかに増強された。同一症例につき末梢血および胸水の増強効果を検討すると、胸水においても末梢血と同程度に増強される例が 6 例に認められ、case 3, 6 のように、胸水の

増強効果が末梢血のそれより高値を示す例も認められた。結核性胸膜炎 10 例について末梢血と胸水の Δ % cytotoxicity を比較すると、両者間に有意差を認めなかった。

c 両疾患における胸水の比較

癌性胸膜炎および結核性胸膜炎の胸水単核球の PPD 添加により誘導される細胞障害活性を比較すると、癌性胸水の Δ % cytotoxicity は、結核性胸水に比較し有意 ($p < 0.05$) に低値を示した。

D IFN 産生能

Table 2 PPD-induced cytotoxicity against Raji (E : T=10 : 1)

	Peripheral blood			Pleural effusion			
	Case	Med(%) ^{a)}	PPD(%) ^{b)}	A % ^{c)}	Med(%)	PPD(%)	A %
Carcinomatous pleurisy	1	2.7	4.0	1.3	0.3	1.9	1.6
	2	0	0	0	0	0	0
	3*	1.9	5.9	4.0	5.7	23.7	18.0
	4	19.6	28.2	8.6	4.9	5.4	0.5
	5	1.0	10.7	9.7	2.5	9.9	7.4
	6	0	0.7	0.7	0.2	0.3	0.1
	7	0.4	2.3	1.9	0	1.5	1.5
	8	16.4	28.8	12.4	0	4.1	4.1
	9	1.3	6.9	5.6	0.1	0.5	0.4
	10	1.6	8.9	7.3	2.2	14.3	12.1
	11	0.2	5.4	5.2	1.7	8.3	6.6
	12	1.1	1.7	0.6	0	2.6	2.6
	Mean±SD			4.8±4.1			4.6±5.6
Tuberculous pleurisy	1	0.8	24.9	24.1	6.6	21.3	14.7
	2**	1.0	12.6	11.6	2.1	10.4	8.3
	3	0	8.4	8.4	36.4	81.2	44.8
	4	0	0	0	0	0	0
	5**	ND ^{d)}	ND	ND	ND	ND	ND
	6	2.7	9.3	6.6	3.0	30.3	27.3
	7	2.1	38.4	36.3	2.6	18.3	15.7
	8	ND	ND	ND	1.5	25.9	24.4
	9	0.2	12.0	11.8	1.6	4.2	2.6
	10	1.8	27.9	26.1	2.1	28.4	26.3
	11	1.2	6.6	5.4	1.9	5.5	3.6
	12	5.5	11.4	5.9	1.2	10.8	9.6
	Mean±SD			13.6±11.4			16.1±13.5
Healthy control (N=10)	Mean±SD			18.4±9.8	ND	ND	

a)-d): See foot note in Table 1 * **: Symbols as in Table 1

PPD 添加により誘導される IFN 産生能 (IU/ml) の結果を Table 3 に示す。なお case number は Table 1 および Table 2 と統一した。

癌性胸膜炎、結核性胸膜炎の末梢血および胸水単核球に PPD を添加し培養すると、IFN が産生された。

癌性胸膜炎および結核性胸膜炎の末梢血の IFN 産生能 (mean±SD) は、健常者に比較し有意 (それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.05$) に低値を示した。しかし癌性胸膜炎と結核性胸膜炎における末梢血の IFN 産生能は、両者間に有意差を認めなかった。癌性胸膜炎、結核性胸膜炎ともに胸水単核球の IFN 産生能は、末梢

血のそれに比較し有意 (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.001$) に高値を示した。さらに、癌性胸膜炎の胸水単核球による IFN 産生能は、結核性胸水に比較し有意 ($p < 0.05$) に低値を示した。なお、産生された IFN 力価と、PPD 添加による細胞障害活性増強効果との間に相関関係を認めなかった。

IV 考 察

最近、呼吸器疾患の病変局所における NK 細胞の研究のひとつとして、気管支肺胞洗浄液の解析が行われている。サルコイドーシスにおいては、末梢血の

Table 3 PPD-induced interferon production

	Peripheral blood			Pleural effusion	
	Case	Med (IU/ml) ^{a)}	PPD (IU/ml) ^{b)}	Med (IU/ml)	PPD (IU/ml)
Carcinomatous pleurisy	1	< 6	76	< 6	2,340
	2	< 6	155	< 6	16
	3*	< 6	12	< 6	343
	4	< 6	161	< 6	1,060
	5	17	17	< 6	2,430
	6	< 6	599	< 6	120
	7	< 6	378	< 6	460
	8	< 6	28	< 6	3,140
	9	< 6	60	14	2,540
	10	< 6	650	< 6	482
	11	< 6	444	< 6	486
	12	< 6	38	< 6	469
	Mean±SD		218±236		1,157±1,119
Tuberculous pleurisy	1	< 6	799	16	6,330
	2**	< 6	306	< 6	893
	3	< 6	99	< 6	10,000
	4	< 6	6	< 6	1,264
	5**	< 6	70	< 6	515
	6	< 6	161	< 6	5,730
	7	< 6	452	< 6	1,320
	8	< 6	20	< 6	5,730
	9	< 6	706	< 6	2,120
	10	< 6	549	< 6	1,930
	11	< 6	114	< 6	1,470
	12	< 6	108	< 6	889
	Mean±SD		283±277		3,183±3,012
Healthy control (N=9)	Mean±SD		878±937	ND ^{c)}	ND

a): medium induced production b): PPD-induced production
c): not done * **: Symbols as in Table 1

Leu 7+, Leu 11+ 細胞 (%) の増加および NK 活性の高値と、肺局所の Leu 7+, Leu 11+ 細胞 (%) の減少および NK 活性の低値が認められると報告されている¹⁵⁾。一方、過敏性肺臓炎においては肺局所と末梢血の Leu 11+ 細胞 (%) は差を認めないにもかかわらず、肺局所の NK 活性が高値を示すとの報告がある¹⁶⁾。これらの報告は、局所免疫能を検討することが両疾患の鑑別診断に有用であることを示唆している。そこで今回著者は癌性胸膜炎および結核性胸膜炎の末梢血と胸水のNK細胞につき検討し、これら

免疫学的検討の臨床上の意義につき検討した。

表面抗原の解析では、両疾患ともに胸水中 Leu 7+ 細胞 (%) および Leu 11+ 細胞 (%) が末梢血に比較し低値を示し、中村らの報告¹⁷⁾と一致していた。両疾患の胸水を比較すると、結核性胸膜炎の胸水中 Leu 7+ 細胞 (%) は癌性胸膜炎に比較し低値を示したが、癌性および結核性胸膜炎ともに胸水中 Leu 7+, Leu 11+ 細胞 (%) が末梢血に比較し低値を示す傾向が認められ、両者の鑑別は表面抗原の解析からは困難と思われた。治療例 (OK-432 および INH, RFP, SM)

における末梢血および胸水中の Leu 7+, Leu 11+細胞 (%) に明らかな差異はなく、今回 data は示さないが、経過観察可能であった結核性胸膜炎においても、治療経過中の Leu 7+, Leu 11+ 細胞 (%) に著しい変化を認めないことより、治療の影響はないと思われた。なお結核性胸膜炎の末梢血 Leu 11+細胞は、癌性胸膜炎および健常者に比較し有意に高値を示したが、現在その臨床的意味は不明である。

癌症例における末梢血 NK 活性は、一般に病期の進展とともに低下するとの報告が多い¹⁸⁾⁻²⁰⁾。一方肺結核症の末梢血 NK 活性については、健常者に比較し上昇⁷⁾、あるいは不変⁸⁾との報告があり一定した見解は得られていない²¹⁾。今回の検討では、各種進行癌としての癌性胸膜炎と、炎症性疾患である結核性胸膜炎の間に有意差を認めず、これら末梢血の NK 活性の検討でも両疾患の鑑別は困難と思われた。

癌症例の局所における NK 活性の研究は、乳癌のリンパ節転移²²⁾、卵巣腫瘍の腹水²³⁾等において行われている。今回、癌性胸膜炎の胸水 NK 活性は、同末梢血に比較して低値を示し、病変局所の NK 活性は低値を示すというこれらの報告と一致していた。なお、OK-432投与例では、末梢血および胸水の K562, Raji に対する細胞障害活性が未治療群に比較し高値を示し、このことは OK-432 の NK 活性増強作用²⁴⁾の影響を示すものと思われた。癌性胸膜炎の胸腔内における NK 活性の低下の原因として、NK 細胞 (Leu 7+, Leu 11+細胞) の減少が考えられた。しかし結核性胸膜炎の胸水 Leu 7+, Leu 11+細胞 (%) が低値にもかかわらず、NK 活性が末梢血より高値を示す例を認めること、さらには結核性胸水中の Leu 7+細胞 (%) は癌性胸膜炎に比較し低値であるが NK 活性は高値を示すことより、NK 細胞数 (%) と NK 活性との間に相関がないことが示された。このことは、これらの monoclonal 抗体で認識されない effector 細胞が存在する可能性を示唆する。事実、慢性関節リウマチの滑液中においては、IgG-Fc receptor 陰性の細胞が K562 を障害することが報告されている²⁵⁾。最近、健常者末梢血の Leu 4 (panT)+・Leu 11-・Leu 19 (NK cell)+ および Leu 4-・Leu 11+・Leu 19+細胞が K562 に対する細胞障害活性を有することが報告され²⁶⁾、結核性胸水中に存在する多数の Leu 4+細胞¹²⁾の一部が K562 に対し細胞障害活性を持つ可能性も考えられる。

さらに、結核性胸水の NK 活性が高値を示すその

他の理由として、結核性胸膜炎においては、NK 細胞の target 細胞との結合能が増強し、さらには結合後の細胞障害能が亢進している可能性がある。最近、マウスにおける Salmonella 感染²⁾ およびヒトにおける Shigella 感染³⁾ に対し、NK 細胞の細胞障害活性が増強されることより、NK 細胞の細菌感染症への関与が指摘されている。今回著者は胸水 NK 活性が高値を示す群の中に、胸水より結核菌が検出された例を認めた。そこでこの NK 活性高値の mechanism を解明する目的で、健常者の末梢血単核球に結核菌の培養上清成分である PPD を添加し、細胞障害活性を検討すると、18~24時間を peak に細胞障害活性が増強され、その後、時間経過とともに増強効果の減少を認めた。このことは、結核性胸膜炎の胸腔内単核球が結核菌を介して activate されている可能性を示し、さらに NK 活性が病期 (浸出期、吸収期) により影響されている可能性を示す。実際、data は示さないが、経過観察可能であった6例の結核性胸膜炎の治療経過による NK 活性の検討では、胸水が減少するにしたがい胸水の NK 活性も低下することを認めている。なお、胸水中より結核菌が認められた例で、胸水の NK 活性が低値を示す例を認めるが、このことも胸水貯留時の病期および治療効果の関与を示唆している。

さらに両疾患の PPD 添加により誘導される K562 および Raji に対する細胞障害活性を検討すると、癌性胸膜炎の胸水では K562, Raji に対し、末梢血では Raji に対し細胞障害活性の低下を認めた。このように、target 細胞として NK 細胞に抵抗性がある Raji を用いることにより両疾患の相違がより明確になった。なお、dataは示さないが PPD 添加前後のリンパ球表面抗原は Leu 4+(pan T cell), Leu 3a+(helper/inducer T cell), Leu 2a+(suppressor/cytotoxic T cell), Leu 7+ および Leu 11+細胞の割合に変化を認めず、さらには PPD 添加による DNA 合成も惹起されなかった。すなわち、この反応系には各リンパ球の population の変化はなく、細胞分裂反応も関与しないことが明らかとなった。そこで PPD 添加による細胞障害活性増強効果の原因を解明する目的で、この培養系における液性因子の関与を検討した。その結果、PPD 添加により IFN の産生が認められた。IFN は NK 活性を増強し、さらにリンパ球は IFN を産生し、自らの活性を高めることが知られている²⁷⁾。癌性および結核性胸膜炎の末梢血の IFN 産生能は健常者に比較し低値を示していた。この理由は不明であるが、胸

水貯留疾患におけるリンパ球の末梢血から胸腔内への移動¹²⁾の影響が考えられる。癌性胸水のIFN産生能は結核性胸水に比較し低値を示すことより癌性胸膜炎における細胞障害活性の低下の一因として、IFN産生能の低下が関与している可能性が考えられた。なお、癌性胸膜炎において、胸水のIFN産生能は十分認められるにもかかわらず細胞障害活性が増強されない例があり、この事実はIFNに対するeffector細胞の反応性の低下を示唆していると思われる。このようにPPDを用いた細胞障害活性の検討をすることにより、癌におけるeffector細胞自体の機能低下を示す所見ばかりでなく、局所免疫能の低下がより明らかとなった。

以上に述べたように、結核性胸膜炎および癌性胸膜炎の局所における免疫動態を末梢血で明らかにすることは困難と思われたが、胸腔内局所のPPD添加による細胞障害活性の検討により両疾患の相違が明確となった。これら局所免疫能の検討は両疾患の鑑別にとってひとつの有益な手段と考えられる。

V 結 語

癌性胸膜炎17例、結核性胸膜炎28例の末梢血および胸水中のNK細胞につき、表面抗原の解析、NK活性を測定した。さらにPPD添加により誘導される細胞障害活性およびIFN産生能の測定を行い、両疾患の相違を比較検討し、以下の結果を得た。

- 1) 癌性胸膜炎の胸水中 Leu 7+, Leu 11+細胞

(%)は末梢血に比較し低値を示し、さらに胸水のNK活性も末梢血に比較し低値を示した。

- 2) 結核性胸膜炎の胸水中 Leu 7+, Leu 11+細胞(%)は末梢血に比較し低値を示したが、胸水のNK活性は、末梢血に比較し高値を示す例を認めた。なお結核性胸水のNK活性は癌性胸水に比較し高値を示した。

- 3) PPDにより誘導されるK562に対する細胞障害活性は、癌性胸膜炎の胸水において低値を示した。さらにPPDにより誘導される癌性胸膜炎の末梢血および胸水のRajiに対する細胞障害活性は、結核性胸膜炎に比較し低値を示した。

- 4) 癌性胸膜炎の胸水単核球のPPDにより誘導されるIFN産生能は、結核性胸膜炎のそれに比較し低値を示した。

以上の結果より、これら局所免疫能の検討は、両疾患の鑑別上ひとつの有益な手段と思われる。

本研究の要旨の一部は、第18回ヨーロッパ臨床免疫およびアレルギー学会(1986年5月、ハンガリー)、第27回日本肺癌学会総会(1986年10月、東京)において発表した。

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員の諸兄に深く感謝致します。

文 献

- 1) Herberman, R. B. and Holden, H. T. : Natural cell-mediated immunity. *Adv Cancer Res*, 27 : 305-377, 1978
- 2) Nencioni, L., Villa, L., Boraschi, D., Berti, B. and Tagliabue, A. : Natural and antibody-dependent cell-mediated activity against *Salmonella typhimurium* by peripheral and intestinal lymphoid cells in mice. *J Immunol*, 130 : 903-907, 1983
- 3) Klimpel, G. R., Niesel, D. W. and Klimpel, K. D. : Natural cytotoxic effector cell activity against *Shigella flexneri*-infected Hela cells. *J Immunol*, 136 : 1081-1086, 1986
- 4) Perussia, B., Star, S., Abraham, S., Franning, V. and Trinchieri, G. : Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B 73.1. *J Immunol*, 130 : 2133-2141, 1983
- 5) Lanier, L. L., Le, A. M., Phillips, J. H., Warner, N. L. and Babcock, G. F. : Subpopulation of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol*, 131 : 1789-1796, 1983
- 6) Abo, T., Miller, C. A. and Balch, M. : Characterization of human granular lymphocyte subpopulation expressing HNK-1 (Leu 7) and Leu 11 antigens in the blood and lymphoid tissues from fetuses, neonates and adults. *Eur J Immunol*, 14 : 616-632, 1984
- 7) Yoneda, T., Kasai, M., Ishibashi, J., Nishikawa, K., Tokunaga, T. and Mikami, R. : Natural killer activity in pulmonary tuberculosis. *Br J Dis Chest* 77 : 185-188, 1983

- 8) Onwubalili, J.K. and Scott, G.M. : Natural killer cell activity in tuberculosis. *Br J Dis Chest*, 79 : 67-76, 1985
- 9) Okubo, Y., Kusama, S. and Yano, A. : PPD-specific proliferative response in humans. 1. Analysis of PPD-specific proliferative cells from tuberculous pleurisy and healthy control with monoclonal antibodies specific for human T cell subsets. *Microbiol Immunol*, 26 : 511-521, 1982
- 10) 大久保喜雄, 和田茂比古, 北沢邦彦, 草間昌三 : 結核性胸膜炎におけるモノクローナル抗体を用いた purified protein derivative (PPD) 特異的T細胞活性機構の解析. *日内会誌*, 73 : 935-943, 1983
- 11) 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*, 34 : 155-159, 1986
- 12) 中田真佐雄, 大久保喜雄, 黒岩 靖, ナムシ・R・ナムシ, 和田茂比古, 草間昌三 : 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—Tリンパ球およびTリンパ球サブセットの解析—. *信州医誌*, 35 : 222-226, 1987
- 13) Jolius, 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
- 14) Kohase, M., Kohno, S., Yamazaki, S., Shishido, A. and Kono, P. : The clinical potential of interferons : Potency standardization of human interferon preparation for clinical trials. pp. 299-309, University of Tokyo Press, Tokyo, 1980
- 15) Agostini, C., Trentin, L., Zambello, R., Luca, M., Cipriani, A., Pizzolo, G. and Semenzato, G. : Phenotypical and functional analysis of natural killer cells in sarcoidosis. *Clin Immunol Immunopathol*, 37 : 262-275, 1985
- 16) Semenzato, G., Agostini, C., Zambello, R., Trentin, L., Chilosi, M., Pizzolo G., Marcer, G. and Cipriani, A. : Lung T cells in hypersensitivity pneumonitis : phenotypic and functional analyses. *J Immunol*, 137 : 1164-1172, 1986
- 17) 中村雅博, 原田泰子, 高本正祇, 石橋凡雄, 篠田 厚 : 結核性胸膜炎と癌性胸膜炎における末梢血および胸水のリンパ球サブセットの解析. *日胸疾会誌*, 24 : 785-791, 1986
- 18) Pross, H. and Baines, M.G. : Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumour target cells. I. The effect of malignant disease. *Int J Cancer*, 18 : 593-604, 1976
- 19) Forbes, J.T., Greco, F.A. and Oldhan, R.K. : Human natural cell-mediated cytotoxicity. II. Level in neoplastic disease. *Cancer Immunol Immunother*, 11 : 147-153, 1981
- 20) 寺沢明夫 : 肺癌患者末梢血単核球 N.K. 活性の検討. *肺癌*, 26 : 37-45, 1986
- 21) Edwards, D. and Kirkpatrick, C.H. : The immunology of mycobacterial diseases. *Am J Respir Dis*, 134 : 1062-1071, 1986
- 22) Kimber, I., Moore, M., Howell, A. and Wilkinson, M.J.S. : Native and inducible levels of natural cytotoxicity in lymph node draining mammary carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 15 : 32-38, 1983
- 23) Mantovani, A., Allavena, P., Sessa, C., Bolis, G. and Mangioni, D. : Natural killer activity of lymphoid cells isolated from human ascitic ovarian tumors. *Int J Cancer*, 25 : 573-582, 1980
- 24) Uchida, A. and Micksche, M. : In vitro augmentation of natural killer activity by OK 432. *Int J Immunopharmacol*, 3 : 365-375, 1981
- 25) Silver, R.M., Redelman, D., Zvaifler, N.J. and Naides, S. : Studies of rheumatoid synovial fluid lymphocytes. I. Evidence for activated natural killer-(NK) like cells. *J Immunol*, 128 : 1758-1763, 1982
- 26) Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R. and Phillips, J.H. : The relationship of CD 16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*, 136 : 4480-4486, 1986
- 27) Timonen, T., Ortaldo, J.R. and Herberman, R.B. : Analysis by a single cell cytotoxicity assay of natural killer (NK) cell frequencies among human large granular lymphocytes and of the effects of human interferon on their activity. *J Immunol*, 128 : 2514-2521, 1982

(62. 1. 5 受稿)