

腎移植患者における Natural Cell-Mediated
Cytotoxicity の検討

社会保険中京病院泌尿器科（部長：大島伸一）

平 林 聡*
小 野 佳 成*
大 島 伸 一NATURAL CELL-MEDIATED CYTOTOXICITY OF
KIDNEY ALLOGRAFT RECIPIENTSSatoshi HIRABAYASHI, Yoshinari ONO
and Shinichi OHSHIMA*From the Department of Urology, Shakaihoken Chukyo Hospital
(Chief: Dr. S. Ohshima)*

Natural cell-mediated cytotoxicity (NCMC) displayed by peripheral blood mononuclear cells of kidney allograft recipients was examined against K562 cells to demonstrate the kinetics of NCMC activity in the posttransplant period. On 44 kidney allograft recipients 301 NCMC assays were performed between 1 and 84 months after transplantation. These patients were treated with the conventional immunosuppressive treatment consisting of steroid and azathioprine. NCMC activity sharply decreased after transplant surgery. A decreased NCMC activity continued during the first 6 months and the mean NCMC value was 19.2 ± 14.1 . In the second 30 months, NCMC activity also constantly decreased, almost to 10. It was lower than that of the first 6 months ($P < 0.01$). After 37 months, some patients restored a normal NCMC activity and others showed a decreased NCMC activity. The mean value was 27.4 ± 20.6 in the third 48 months.

The depression of NCMC activity might be caused by the large dose of steroid and azathioprine in the first 6 months. In the third 48 months, NCMC activity might be dependent on the dosage of azathioprine alone. The activation of NCMC activity might be caused by acute rejection crisis.

Key words: Natural cell mediated cytotoxicity, NCMC, Kidney transplantation

はじめに

Natural Killer (NK) 細胞は、その存在が報告されて以来、その性質などについては解明されつつあるが、未だにその細胞の所属などを含め未解明な点も多い。特にその臨床的意義についてはほとんど不明であ

るが、*in vitro* における腫瘍細胞あるいは Virus 感染細胞に対する態度により、antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) を担う Killer 細胞とともに悪性腫瘍、あるいは Virus 感染症に対する初期の防御系であろうと言われている。

腎移植では既にいくつかの腎移植患者の natural cell-mediated cytotoxicity (NCMC) 活性の変化についての報告がなされており、移植患者に de

* 現：小牧市民病院泌尿器科

novo 悪性腫瘍の発生頻度が高いことあるいは拒絶反応と NCMC 活性との関連についても議論がなされている。しかしながらそれらの多くは腎移植後の一時期の移植患者の NCMC 活性を検索し検討しているにすぎない。

今回、腎移植患者における NCMC 活性の推移を明らかにする目的で、腎移植前から腎移植後7年までの全期間を通してさまざまな時期での NCMC 活性を測定し、免疫抑制剤、また拒絶反応との関係を検討した。

対 象

対象は、1973年9月より1981年4月までに私どもが施行した同種生体腎移植患者44例である。これらの症例の年齢、性別、提供者、組織適合度は Table 1 に示した。

腎移植後の免疫抑制療法は azathioprine (Az) および steroid (St) 剤の併用を主体とし、症例によって

Table 1. 対象患者の年齢、性および組織適合性検査結果

同種生体腎移植	44例
年 齢	6～59歳
(平均±SD)	(27.8±11.1歳)
男 女	33例：11例
提供者 両親	35例
同胞	11例
MLC	
Stimulation Index	0.6～50.2
(平均±SD)	(6.2±8.2)
HLA AB	
Missmatch 0	9例
1	24例
2	11例

は、ALG (AHLG: ミドリ十字社製) を併用した。Az は腎移植4日前より 3 mg/kg/day にて投与を開始し、白血球数にあわせて投与量を増減した。St 剤は、手術日に methylprednisolone を 1,000 mg 投与し、prednisolone は手術前日より 5.0 mg/kg/day で1術後日まで3日間投与した。2術後日より 2.0 mg/kg/day にて投与し3日ごとに 10 mg ずつ減量し、1.0 mg/kg/day となった後より1週間ごとに 10 mg ずつ減量し、15～20 mg/day を初期維持量とした (Fig. 1)。

急性拒絶反応に対する治療は methylprednisolone を 1,000 mg 投与し、prednisolone を 200 mg まで増量し漸減する方法にて行なった。また症例によっては ^{60}Co 照射 (1.5 Gy×3日間) を行なった。

方 法

NCMC 活性は次の方法にて測定した。

Effector cell: 対象者より採取したヘパリン加末梢血より、Ficoll-Conray 比重遠沈法にて mononuclear cell を得、これを2回洗浄後培養液に $1 \times 10^6/\text{ml}$ となるように調整し浮遊させた。培養液には非働化した fetal calf serum (Gibco 社製) を20%添加した RPMI 1640 培養液 (Gibco 社製) を用いた。

Target cell: ヒト慢性骨髄性白血病より樹立された cell line である K562 を target cell として用いた。Na $_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear 社製) にて標識後 $4 \times 10^5/\text{ml}$ となるように調整し培養液に浮遊させた。

NCMC 活性測定: Effector cell 浮遊液 200 μl と target cell 浮遊液 10 μl (effector cell: target cell = 50:1) をU底マイクロプレート (Nunc 社製) 内にて5% CO $_2$ 加湿下 37°C にて4時間混合培養し、上清に放出された ^{51}Cr の量を測定し% cytotoxicity を次式にて算出した。

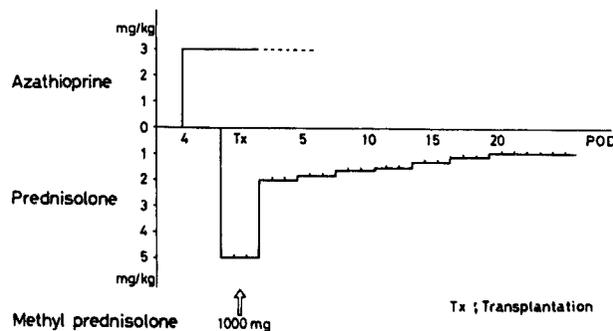


Fig. 1. 免疫抑制剤投与方法

Azathioprine は白血球数にあわせて投与量を増減した。

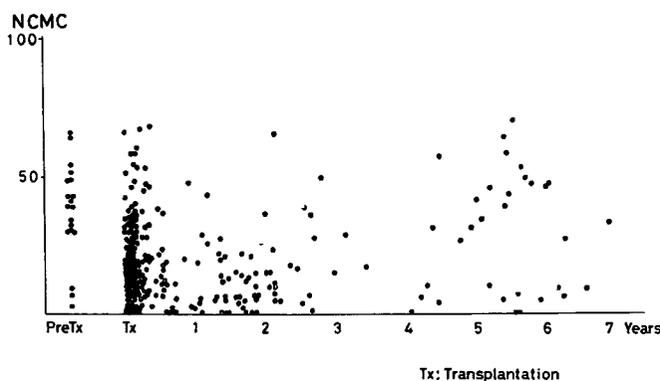


Fig. 2. 全期間の natural cell-mediated cytotoxicity (NCMC) 活性

% Cytotoxicity =

$$\frac{\text{Experimental R} - \text{Spontaneous R}}{\text{Maximum R} - \text{Spontaneous R}} \times 100$$

(R: release)

spontaneous release は target cell に培養液のみを, maximum release には target cell に蒸留水を加えて培養したものを測定して得られた値をあてた. 測定は triplicate にて行なった. なお, 実験ごとに生ずるばらつきを補正するために既に報告した方法²⁾にて NCMC index を算出し NCMC 活性を求めた.

検討方法

腎移植患者の NCMC 活性の推移を明らかにする目的で, 腎移植前, 腎移植後 1 カ月, 3 カ月, 6 カ月, その後 3 年までは 6 カ月ごと, その後 5 年までは 1 年ごとおよび 5 年以降と分けて NCMC 活性を求めた.

次いで, 腎移植患者の NCMC 活性の推移に影響を与えると考えられる, (1) 拒絶反応, (2) 免疫抑制剤の投与量との関係を検討した. 拒絶反応のうち急性拒絶反応との関係では, 急性拒絶反応治療直前に測定した NCMC 活性で検討し, また, 慢性拒絶反応との関係では, 血中クレアチニン値が 2 mg/dl 以上で臨床的に慢性拒絶反応と診断された時期に測定した NCMC 活性について検討した.

免疫抑制剤のうち, Az は, 腎移植後の時期および症例により投与量に差があるため, 腎移植後 6 カ月, 7 カ月~3 年, 4 年~7 年の 3 期間に分け, 各期間における NCMC 活性と NCMC 活性測定時期の 1 日あたり体重あたりの Az 投与量との関係を検討した.

St 剤は急性拒絶反応がない限り一定の投与方法で投与されているため, 投与量がそれぞれ比較的一定である腎移植後 1 カ月, 2 カ月~3 カ月, 4 カ月~6 カ月, 7 カ月~12 カ月, 13 カ月以降の 5 期間に分け, 各期間

の 1 日あたり体重あたりの St 剤投与量と, NCMC 活性の関係を検討した.

結 果

生体腎移植患者間 44 例を対象として腎移植前より移植後 7 年までに NCMC 活性は 301 回測定した. 測定した NCMC 活性を (Fig. 2) に示した.

(1) 腎移植前の NCMC 活性

腎移植施行 1~2 週間前に NCMC 活性を測定した. NCMC 活性は 3~66.1, 平均±SD: 40.9±18.8 でありこれは既に報告した健康人 20 名の NCMC 活性 21.6~67.2, 平均±SD: 49.9±12.4 と比べ差はみられなかった³⁾.

(2) 腎移植後の NCMC 活性の推移

腎移植後より NCMC 活性は著しく低下し腎移植後 1 カ月までの NCMC 活性は 0~65.7, 平均±SD: 18.8±13.2 であった. 腎移植後 2 カ月から 3 カ月までは 0~67.2, 平均±SD: 20.9±16.7, 4 カ月から 6 カ月まででは 0~67.5, 平均±SD: 21.9±17.2 であった. 腎移植後, 6 カ月を経ると NCMC 活性は更に低下し, 7 カ月から 12 カ月では 0~48.2, 平均±SD: 12.1±12.4, 13 カ月から 18 カ月では 0~44.3, 平均±SD: 13.3±12.0, 19 カ月から 24 カ月では 0~35.6, 平均±SD: 11.9±10.3, 25 カ月から 30 カ月では 4.7~64.8, 平均±SD: 18±16, 31 カ月から 36 カ月では 0~48.8, 平均±SD: 25±20.8 と NCMC 活性は著しく低い値をとりつづけ, 標準偏差値も小さくなっていった. しかし, 腎移植後 3 年を経過すると症例のなかには NCMC 活性が高値をとるものもみられるようになり, 3 年以降 4 年では 14.6~73.8, 平均±SD: 33.6±27.5, 5 年では 0~57.2, 平均±SD: 23.0±19.4, 5 年以降 7 年では 0~69.7, 平均±SD: 31.9±24.5 であった (Fig. 3).

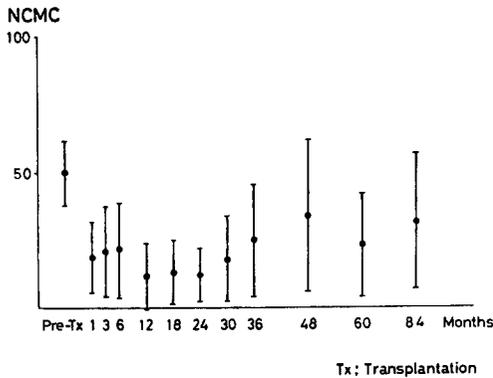


Fig. 3. 腎移植前および腎移植後各期間の natural cell-mediated cytotoxicity (NCMC) 活性の推移 (平均±SD)

これらの結果をまとめると、腎移植前は健康人と同様であった NCMC 活性は、(1) 腎移植後6ヵ月までは症例によってばらつきがあるものの低値をとり、(2) 7ヵ月から3年までは更に低下し、著しい低値をとり、症例によるばらつきも少なかった。しかし(3) 4年を経過した後は再び高値をとる症例が出現し、NCMC 活性の平均値は移植前の値までも回復はしないものの増大した。

(3) 拒絶反応と NCMC 活性

(a) 急性拒絶反応

腎移植後6ヵ月以内に10例に観察された11回の急性拒絶反応合併時の NCMC 活性は13.0~66.0, 平均±SD: 30.5±16.0であった。これらの値を同じ時期の

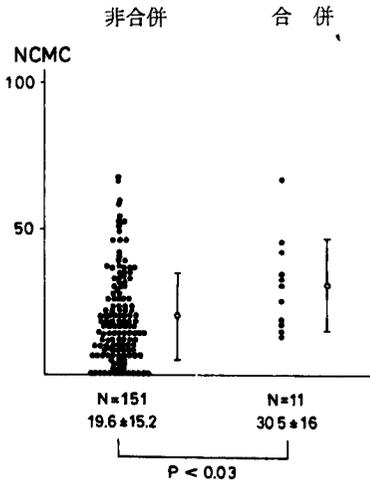


Fig. 4. 急性拒絶反応合併例と非合併例の natural cell-mediated cytotoxicity (NCMC) 活性の比較

拒絶反応を合併していない23例151回の測定値, 0~67.1, 平均±SD: 19.6±15.2と比較すると急性拒絶反応合併時には NCMC 活性は有意に高値を示した ($p < 0.03$) (Fig. 4).

(b) 慢性拒絶反応

慢性拒絶反応合併時期の NCMC 活性は、19ヵ月から66ヵ月の間に4例に20回測定し、0~69.7, 平均±SD: 14.5±17.5であった。これは、同時期の慢性拒絶反応非合併19例の89回の測定値0~84.6, 平均±SD: 20.7±19.0と比較して差は認められなかった (Fig. 5).

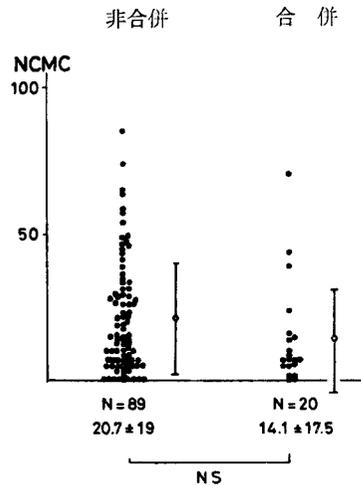


Fig. 5. 慢性拒絶反応合併例と非合併例の natural cell-mediated cytotoxicity (NCMC) 活性の比較 (NS: not significant)

(4) 免疫抑制剤投与量と NCMC 活性

(a) Azathioprine (Az) 投与量との比較

腎移植後より、移植後7年までの全期間に、Az 非投与例を除いた39例に211回の NCMC 活性の測定を行なった。これを前述の3期間に分けて検討すると、腎移植直後より6ヵ月までの期間では20例109回の測定を施行し、Az 投与量は0~2.9 mg/kg/day, 平均±SD: 1.47±0.84 mg/kg/day で、NCMC 活性は0~67.5, 平均±SD: 19.2±14.1であった。またこの期間内の Az 投与量と NCMC 活性の間には、相関係数-0.25にて有意な負の相関を認めた ($p < 0.01$)。腎移植後7ヵ月から3年までは14例に対し75回の測定を施行し、Az 投与量は0~2.7 mg/kg/day, 平均±SD: 1.15±0.56 mg/kg/day で、この期間の NCMC 活性は0~64.8, 平均±SD: 13.7±13.7であった。この期間の Az 投与量と NCMC 活性の間では相関係数

-0.21で有意な相関を認めなかった。腎移植後4年から7年の期間では、10例に27回の測定を施行し、Az投与量は0~2.6 mg/kg/day, 平均±SD: 0.7±0.95 mg/kg/dayで、NCMC活性は0~69.7, 平均±SD: 27.4±20.6であった。この期間内のAz投与量とNCMC活性の間には相関係数-0.66にて有意な負の相関を認めた ($p<0.01$)。

これらの関係については Fig. 6~8, Table 2 に示したが、Az投与量は、腎移植直後より6カ月間、腎移植後7カ月より3年までの期間、腎移植後4年より7年までの期間の順に減少し、特に後二者間では統計学的に有意に減少していたが ($p<0.03$)、NCMC活性では、腎移植後7カ月から3年までの期間が他の前後の2期間に比し有意に低く ($p<0.009$, $p<0.003$)、また他の2期間ではAz投与量とNCMC活性間に有意な負の相関を認めたが、腎移植後7カ月から3年までの期間では、Az投与量とNCMC活性の間に有意な相関を認めなかった。

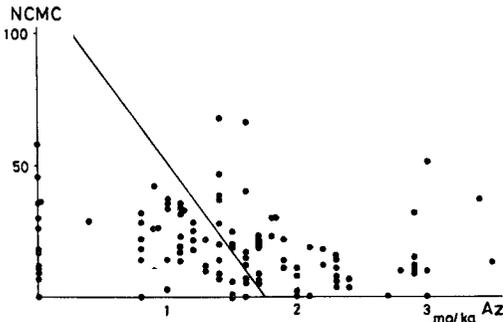


Fig. 6. 腎移植後6カ月以内のAzathioprine (Az)投与量と natural cell-mediated cytotoxicity (NCMC) 活性 ($r=-0.25$, $p<0.01$)

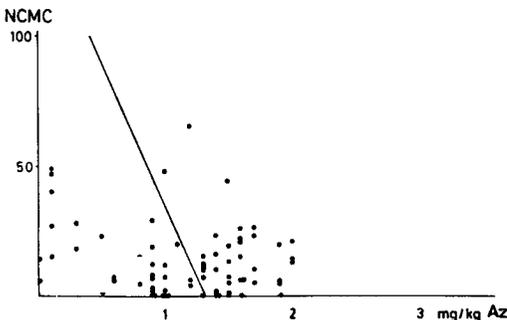


Fig. 7. 腎移植後7カ月から3年までのAzathioprine (Az)投与量と natural cell-mediated cytotoxicity (NCMC) 活性 ($r=-0.21$, not significant)

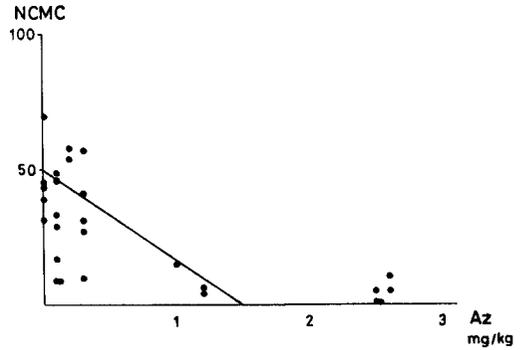


Fig. 8. 腎移植後4年から7年までのAzathioprine (Az)投与量と natural cell-mediated cytotoxicity (NCMC) 活性 ($r=-0.66$, $p<0.01$)

Table 2. 期間別にみたAzathioprine (Az)投与量と natural cell-mediated cytotoxicity (NCMC) 活性 (NS: no significant)

移植後期間 (月)	Az 投与量 mg/kg	NCMC
0~6	1.47±0.84	19.2±14.1
7~36	1.15±0.56	13.7±13.7
37~84	0.7±0.95	27.4±20.6

*1: NS, *2: $p<0.03$, *3: $p<0.01$, *4: $p<0.003$
*5: NS

(b) Steroid (St) 剤投与量との比較

前述した各期間の St 剤投与量と、NCMC 活性を Table 3 に示した。腎移植前と比較しすべての期間でNCMC活性は低値を示したが、各期間のNCMC活性の間では、差がみられなかった。

Table 3. 期間別にみたSteroid (St) 剤投与量と natural cell-mediated cytotoxicity (NCMC) 活性

移植後期間 (月)	St 投与量 mg/kg	NCMC
0~1	2.24	18.8±13.2
2~3	0.49	20.9±16.7
4~6	0.33	21.9±17.2
7~12	0.18	12.1±12.4
13~84	0.16	18.0±17.1

考 察

腎移植後のNCMC活性について既に報告された内容を検討してみると現時点では次のようにまとめることができる。腎移植後から腎移植後3~4年までの期間の腎移植患者のNCMC活性の推移については、腎移植直後より急速に低下し、そのまま続くと報告さ

れている。しかし、腎移植後4～5年を経過すると、NCMC活性が正常値化しているもの⁹⁾、あるいは、移植後低下したNCMC活性が上昇することなく低値をとりつづけるという報告⁵⁾があり一定していない。私どもの今回の検討でも、腎移植前に健康人と同等であったNCMC活性は、腎移植直後より低値をとり、移植後6カ月を経ると更に著明な低値を示した。しかし、移植後4年を経過すると、低値傾向は続くものの症例によっては高値をとるものが出現し、前述のNCMC活性が正常化するという形をとるものと低値が持続するという形をとる両者がみられた。したがって腎移植後4～5年を経過した患者でのNCMC活性は、患者によって異なり、腎移植後早期に低下したままこれが続くものと腎移植前値までは回復しないものの上昇するものがあると考えられる。

次いで、今回の検討で明らかにされた腎移植後のNCMC活性の推移—腎移植後6カ月まで、移植後7カ月から3年まで、移植後4年以降の3期のNCMC活性の変化の機序についての検討にうつる。腎移植後6カ月までの時期にNCMC活性の著明な低下をもたらす原因としては(1)手術侵襲、(2)大量の免疫抑制剤投与、が考えられるが、手術侵襲によるNCMC活性の低下は24～72時間にて回復すると報告⁶⁾されていることにより否定的である。AzについてもSt剤についてもそれぞれの薬剤がNCMC活性を低下させるということはずでにヒトでの腎移植患者を経時的にみた報告⁷⁾やマウスでの実験⁸⁾あるいはヒトのmononuclear cellを用いた*in vitro*の実験⁹⁾で明らかにされている。今回の対象例のAzの平均投与量は1.5 mg/kg/day、St剤も移植後1カ月間で平均2.24 mg/kg/day、6カ月間でも0.7 mg/kg/day投与されており、この投与量はNCMC活性を抑制するのに充分な量であり、したがってこれらの免疫抑制剤がNCMC活性の抑制に重要な役割を果たしていると考えるのが妥当であろう。

次に、腎移植後7カ月より3年までの時期のNCMC活性の低下についてであるが、この時期には腎移植後6カ月までの時期と比較して、AzおよびSt剤とも投与量が減少しているにもかかわらずNCMC活性は更に低下している。したがって、この時期では免疫抑制剤以外の因子の影響についても考えねばならない。この時期での違いのひとつは拒絶反応の合併がみられないことである。急性拒絶反応合併時にNCMC活性が有意に高値をとることは既に報告されており¹⁰⁾、また今回の検討でも明らかである。しかし拒絶反応非合併時のNCMC活性と比較してもこの時期のNCMC

活性は低い拒絶反応の有無のみでこの現象を説明することは困難であり更に他の因子の影響を考えねばならない。腎移植患者は人為的、恒常的に薬剤による免疫抑制状態におかれるが長期にわたって移植腎の生着が得られる状況下では、いわゆる免疫学的寛容状態が出現することが知られている。これらのことを考えると移植後長期を経た移植患者のNCMC活性の調節機序もこのような免疫状態を起こすなんらかの因子の影響を受けていると考えられる。すでに移植腎機能が安定した移植後6カ月から35カ月の移植患者でNCMC抑制性細胞の存在が報告されており¹¹⁾、今回の検討ではその検索は行なっていないが、時期的には一致していることからこのNCMC抑制性細胞の関与があるものと考えている。

腎移植後4年を経過すると、症例によりNCMC活性が高値をとる症例が出現してくることが認められたが、これらの症例では、St剤投与量は他の低値をとり続けている症例とは変わらないものの、Az投与量は少なく、また、この時期でのNCMC活性は、Az投与量と強い負の相関を示していることから、この時期でのNCMC活性は、Azの投与量の影響を多く受け、Azの投与量が少ない場合に高い値をとると考えられる。

最後に、腎移植患者にみられる悪性腫瘍の高頻度発生とNCMC活性の問題について述べる。一般に、NCMC活性は既に述べたように悪性腫瘍の発生に密接に関係すると考えられており、NCMC活性が低い場合にその発生頻度が増加すること¹²⁾が知られている。今回の検討では、悪性腫瘍を合併した腎移植患者のNCMC活性を検索していないため断定はできないが、腎移植患者のde novo悪性腫瘍の発見時期が平均38カ月であり¹³⁾、この時期のNCMC活性が最も低い値をとっているということと関連して考えてみると興味深い。

結 語

私どもが施行した同種生体腎移植44例を対象としNCMC活性を検索し検討を加え報告した。

1) 腎移植手術直後よりNCMC活性は著しく低下し腎移植後6カ月を経ると更に低値をとりその傾向は腎移植後3年まで続き、4年を経過すると、再び高値をとる症例がみられた。

2) 急性拒絶反応合併時、NCMC活性は有意に高値を示したが、慢性拒絶反応合併時は不変であった。

3) 免疫抑制剤とNCMC活性の検討よりNCMC活性の抑制に、腎移植後より6カ月の期間ではSt剤

および Az 剤の関与が、また、腎移植後 4 年以降の時期では Az 剤の関与が示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました社会保険中京病院太田裕祥院長、御校閲を賜りました名古屋大学泌尿器科学教室三矢英輔教授に深謝の意を表します。

文 献

- 1) Pross HF and Braines MG: Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. 1. The effect of malignant disease. *Int J Cancer* **18** : 593~604, 1976
- 2) Ono Y, Hirabayashi S, Ohshima S and Koide Y: Natural cell-mediated cytotoxicity in long-term kidney transplant recipients. *Transplant Proc* **13**: 1508~1510, 1981
- 3) 小野佳成・平林 聡・絹川常郎・大島伸一・藤田民夫・小出幸夫：長期移植腎生着患者における natural cell-mediated cytotoxicity. *移植* **15** : 197~203, 1980
- 4) Moreau JF, Ythier A and Soullillou JP: Natural killer activity in kidney allograft recipients. *Transplant Proc* **13** : 1610~1613, 1981
- 5) Rigby RJ, Gollogly RK, Robinson MF, Hardie IR and Petric JJB: Natural cell-mediated cytotoxicity and skin cancer in long-term renal allograft recipients. *Transplantation* **37**: 526~529, 1984
- 6) Guillou PJ, Hegarty J, Ramsden C, Davison AM, Will EJ and Giles GR: Changes in Human natural killer activity early and late after renal transplantation using conventional immunosuppression. *Transplantation* **33**: 414~421, 1982
- 7) Prince HE, Ettenger RB, Dorey FJ, Fine RN and Fahey JL: Azathioprine suppression of natural killer cell activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity in renal transplant recipient. *Transplant Proc* **16**: 1475~1477, 1984
- 8) Mantovani A, Luini W, Peri G, Vecchi A and Spreafico F: Effect of chemotherapeutic agent on natural cell-mediated cytotoxicity in mice. *J Natl Cancer Inst* **61**: 1255~1261, 1978
- 9) Moreau JF, Soullillou JP, Ythier A, Hegaret A and Fauconnier B: Decrease in natural killer cell activity in kidney allograft recipients. *Ann Immunol (Inst Pasteur)* **134**: 191~205, 1983
- 10) Weber B, Welte M, Hammer C, Stadler J, Koller C, Caspo C, Land W, Hillebrand G and Castro M: Increase of natural killer cells in rejecting kidney graft. *Transplant Proc* **16**: 1177~1178, 1984
- 11) Ono Y, Kerman RH and Kahan BD: Natural cell-mediated cytotoxicity and suppressor activity for natural cell-mediated cytotoxicity in long-term renal transplant patients. *Transplantation* **34**: 103~107, 1982
- 12) Herberman RB: Mechanisms of cytotoxicity by NK cells. Herberman RB and Callewaert DM, Academic press, Orland Florida, 1985
- 13) Penn I: Tumor incidence in human allograft recipients. *Transplant Proc* **11**: 1047~1051, 1979

(1986年12月4日迅速掲載受付)