

# Studies on Natural Killer Cell Activity and Natural Killer Cell Surface Markers in Children with Atopic Dermatitis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8100">http://hdl.handle.net/2297/8100</a>

## 小児アトピー性皮膚炎におけるNK細胞活性および NK細胞表面マーカーに関する研究

金沢大学医学部公衆衛生学講座 (主任: 岡田 晃教授)

木 村 悟

(平成1年2月4日受付)

小児アトピー性皮膚炎患者におけるNK細胞の免疫学的特徴を重症度別に検討する目的で本研究を行った。アトピー性皮膚炎患者39人(男性19人, 女性20人)の年齢は9~15歳(平均年齢11.9歳)で, 重症度別に軽症14人, 中等症15人, 重症10人の3群に分類した。また, 対照として9~15歳の健常児16人(男性9人, 女性7人)を選んだ。 $^{51}\text{Cr}$  release cytotoxic assayによるnatural killer (NK)細胞活性およびsingle cell assay (SCA)によるNK細胞活性はともに健常児に比べ重症群で有意に低下した。また, interleukin-2 (IL-2) およびinterferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )による増強については, 重症群でIFN- $\alpha$ による% specific  $^{51}\text{Cr}$  releaseの増強は認められなかったが, 軽症群および中等症群でNK細胞活性はIL-2およびIFN- $\alpha$ によって有意に増強された。一方, Leu-7陽性細胞のポピュレーションは健常児との間に有意差は認められなかったが, Leu-11c陽性細胞のポピュレーションは中等症群で有意に増加した。また, アトピー性皮膚炎患者および健常児において, % specific  $^{51}\text{Cr}$  releaseはSCAおよびLeu-11c陽性細胞との間に有意な正の相関関係が認められた。以上より, 重症患者ではNK細胞の標的細胞結合能力および標的細胞傷害能力の低下が, 中等症患者ではNK細胞の機能低下および数量的増加が認められた。小児アトピー性皮膚炎患者におけるNK細胞の免疫学的特徴を横断的にとらえ, 各重症度におけるそれぞれの特徴を明らかにすることができた。今後, 縦断的研究によりさらにその推移を追跡できれば, 小児期におけるNK細胞機能の測定は重症度を客観的に把握し, 予後を推測するための1つの手段になりうると思われる。

**Key words** atopic dermatitis, natural killer cell,  $^{51}\text{Cr}$  release cytotoxic assay, single cell assay, surface marker

アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis, AD) の患者は皮膚感染症に罹患しやすく, しかも重症になりやすいことが知られており, 合併しやすい疾患として伝染性膿痂疹<sup>1)</sup>などの細菌感染症, 伝染性軟属腫<sup>2)</sup>・尋常性疣贅<sup>3)</sup>・Kaposi 水痘様発疹症<sup>4)</sup>などのウイルス感染症があげられている。これらの皮膚感染症を合併しやすい理由として, 強い痒みによる掻破が以前からいわれているが, 近年本症における免疫異常, おそらく細胞性免疫の異常による可能性が考えられている。この点

に関して, しかし, AD患者における遅延型皮膚反応の低下<sup>5,6)</sup>, リンパ球の幼若化因子に対する反応性の低下<sup>6-8)</sup>およびサブレッサーT細胞の減少<sup>9,10)</sup>などを示した報告は多数あるが, ウイルス感染細胞の破壊に関するnatural killer cell (NK細胞)の活性のAD患者における変化に関する報告はまだ少ない。

一方, NK細胞の活性測定には, 従来その細胞傷害活性を細胞集団で測定する方法である $^{51}\text{Cr}$ 放出細胞傷害試験 ( $^{51}\text{Cr}$  release cytotoxic assay,  $^{51}\text{Cr}$ R-

Abbreviations: ACD, acid citrate dextrose; AD, atopic dermatitis;  $^{51}\text{Cr}$ RCA,  $^{51}\text{Cr}$  release cytotoxic assay; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; IFN- $\alpha$ , interferon- $\alpha$ ; IL-2, interleukin-2; NK, natural killer; PBS, phosphate buffered saline; PE, phycoerythrin; SCA, single cell assay

CA)<sup>11,12</sup>が用いられていたが、近年免疫学の進歩に伴い新しい手法が開発されてきた。なかでもモノクローナル抗体を用いて検出するNK細胞表面マーカー解析<sup>13-15</sup>や単一細胞レベルで細胞傷害活性を検定しうる単一細胞傷害試験 (single cell assay, SCA)<sup>16-20</sup>が有用とされ、これらの方法によりNK細胞活性を多角的にとらえることが可能となってきた。

そこで著者は、<sup>51</sup>CrRCA, SCA およびNK細胞表面マーカー解析を用いてAD患者におけるNK細胞活性を測定し、異常の有無を検討した。また、ADの重症度とNK細胞活性との関連を検討した。

### 対象および方法

#### I. 対 象

金沢大学医学部附属病院、石川県立中央病院、氷見市民病院、公立加賀中央病院の各皮膚科外来を訪れたAD患者39人(男性19人、女性20人)を対象とした。患者の年齢は9~15歳(平均年齢11.9歳)であった。ADの診断は上原・太藤の診断基準<sup>21</sup>に基づき、さらにADの重症度により次の3群に分類した。

軽症：乾燥性のアトピー皮膚が主体のもの。

中等症：乾燥性のアトピー皮膚に加えて、四肢および体幹に限局性の苔癬化局面を有するが、その範囲が広範囲でないもの。

重症：典型的なアトピー性皮膚炎で、苔癬化の程度が顕著でその範囲が広範なもの。

上記の重症度により分類すると、対象患者は軽症14人、中等症15人、重症10人であった。ただし、AD患者を集めるにあたって、各群の対象数なるべく等しくなるように選んだ。また、NK細胞活性への影響を避けるため、副腎皮質ホルモンの全身投与により治療中の患者は対象から除外した。

なお、対照例として9~15歳で同一家系内にアレルギー性疾患のない健常児16人(男性9人、女性7人)を選んだ。

#### II. 末梢血単核球の分離

末梢静脈血を10mlヘパリン採血後、リン酸緩衝塩類溶液(phosphate buffered saline, PBS)(日水製薬, 東京)にて2倍希釈したものをリンパ球分離液(lymphocyte separation medium, LSM)(Litton Bionetics, U. S. A.)に重層し、1500rpm 20分間遠心した。遠心後、単層に分離した末梢血単核球を採取し、PBSにて1800rpm 10分間、引続き1000rpm 5分間遠心洗浄し、10%非動化牛胎児血清(fetal bovine serum, FBS)(GSL, U. S. A., lot. 10091)添加RPMI1640溶液(日水製薬, 東京)に浮遊した。さら

に、この浮遊液を60×15mm組織培養ディッシュ(Falcon #3002, U. S. A.)に入れ、37°C 5% CO<sub>2</sub>気相下で一晩静置した。翌日、この浮遊液を10% FBS添加RPMI1640溶液にて1000rpm 5分間2回遠心洗浄し、0.2%トリパンブルーで染色して生細胞数を算定し、2×10<sup>5</sup>個/mlに調整してeffector cellとした。

#### III. <sup>51</sup>CrRCA

<sup>51</sup>CrRCAは押味<sup>19</sup>の方法に準じて行った。ヒト慢性骨髄性白血病由来細胞株K562細胞に、50μCiに相当する<sup>51</sup>Cr(Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>, 1mCi/ml)(第一ラジオアイソトープ研究所, 東京)を加えて37°Cで2時間培養した。培養後、10% FBS添加RPMI1640溶液にて800rpm 5分間4回遠心洗浄し、細胞数を1×10<sup>4</sup>個/mlに調整してtarget cellとした。effector cellとtarget cellを各々1mlづつ(E:T=20:1)triplicateで小チューブに加え、37°C 5% CO<sub>2</sub>気相下で4時間混合培養した。培養後、2000rpm 5分間遠心し、上清1mlを採取して、細胞沈渣を含む残り1mlとともにオートガンマシンチレーションカウンター(アロカ, 東京)で、放出された<sup>51</sup>Crの放射活性を測定した。特異的<sup>51</sup>Cr放出値(% specific <sup>51</sup>Cr release)を下記の式により求め<sup>51</sup>CrRCAによるNK細胞活性値とした。

% specific <sup>51</sup>Cr release

$$= \frac{\{(\text{experimental } ^{51}\text{Cr release} - \text{spontaneous } ^{51}\text{Cr release}) / (\text{maximum } ^{51}\text{Cr release} - \text{spontaneous } ^{51}\text{Cr release})\} \times 100}{}$$

自然<sup>51</sup>Cr放出値(spontaneous <sup>51</sup>Cr release)はtarget cell単独培養した際の、また最大<sup>51</sup>Cr放出値(maximum <sup>51</sup>Cr release)はtarget cellに1% triton X-100(和光純薬, 大阪)を加えた際の<sup>51</sup>Cr放出量により算出した。

#### IV. SCA

SCAの測定はGrimm<sup>16</sup>および内田<sup>20</sup>の方法に準じて行った。細胞数を4×10<sup>5</sup>個/mlに調整した単核球(effector cell)とK562細胞(target cell)を、各々0.5mlづつ小チューブに加え混和したのち、37°Cで10分間培養した。一方、0.1%アガロース(Agarose 2)(同仁化学研究所, 東京)を完全に溶解したのち、37°Cの恒温槽中に保温してその液体状態を保持した。培養したeffector cellとtarget cellの浮遊液1.0mlに、あらかじめ準備したアガロース1.0mlを静かに混ぜ、素早く60×15mm組織培養ディッシュ(Falcon #3002, U. S. A.)上に均一に塗布した。アガロースが完全に凝固したのち、アガロースが乾燥しないように10% FBS添加RPMI1640溶液を1.0ml重層し、37

℃5% CO<sub>2</sub> 気相下で4時間培養した。また、対照として target cell のみを 1.0ml 全く同様に処理した。

培養後、重層した10% FBS 添加 RPMI1640 溶液を除去し、0.25% トリパンプブルー液 1.0ml をのせ、室温にて5分間染色した。染色後、トリパンプブルーを除去して10% FBS 添加 RPMI1640 溶液を重層し、余分なトリパンプブルーを脱染色した。

染色した各標本を光学顕微鏡200倍の倍率下において鏡検した。まず、対照として作製した target cell のみの標本で target cell を500個数え、その中で自然に死滅している target cell 数を求め、その百分率で表し自然死標的細胞比率 (% spontaneous target death) とした。ついで、各標本ごとに effector cell を500個数え、その中で target cell に結合している effector cell 数を求め、その百分率で表し結合体形成率 (% conjugate) とした。さらに、effector-target 結合体を100個数え、その中で target cell が死滅している結合体数を求め、その百分率を算出した上で、真に effector cell の傷害によって target cell が死滅した結合体の比率を求め、この百分率と (1 - % spontaneous target death/100) の積を算出し細胞傷害結合体比率 (% lytic conjugate) とした。最後に、以上で求めた各比率より、% NK すなわちキラー活性を有する細胞の末梢血単核球に占める比率を、下記の式により求めた。

$$\% \text{NK} = (\% \text{conjugate}/100) \times (\% \text{lytic conjugate}/100) \times 100$$

#### V. IL-2, IFN- $\alpha$ 処理後の <sup>51</sup>CrRCA および SCA

interleukin-2 (IL-2) および interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) による <sup>51</sup>CrRCA および SCA への影響をみる目的で、分離した  $2 \times 10^5$  個/ml の単核球 1ml に IL-2 (ENI, U. S. A.) (lot. 1977-90) 100  $\mu$ l, IFN- $\alpha$  (日本ケミカルリサーチ, 神戸) (lot. 001; 100U/100  $\mu$ l) 100  $\mu$ l およびその両者を添加し、37℃ 5% CO<sub>2</sub> 気相下で2時間培養処理を加えた。これを洗浄後、effector cell として <sup>51</sup>CrRCA および SCA を行った。

#### VI. Leu-7 および Leu-11c による NK 細胞表面マーカーの解析

NK 細胞に特異性の高いモノクローナル抗 Leu-7 抗体、抗 Leu-11c 抗体を用いて解析した。acid citrate dextrose (ACD) 液添加真空採血管で採血した末梢静脈血 100  $\mu$ l に塩化アンモニウムを主体とする赤血球溶解液 10ml を加え完全に溶血させた。溶血を確認した上で、PBS 10ml にて 900rpm 4分間遠心洗浄し、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 Leu-7 抗体

および phycoerythrin (PE) 標識抗 Leu-11c 抗体 (Becton Dickinson, U. S. A.) を各々 20  $\mu$ l 加え、氷冷中で30分間反応させた。反応後、再び PBS 10ml にて 900rpm 4分間遠心洗浄し、Fluorescence Activated Cell Sorter analyzer (FACS analyzer) (Becton Dickinson, U. S. A.) で Leu-7 陽性細胞および Leu-11c 陽性細胞のリンパ球に占める割合を測定した。

#### VII. 統計処理

測定値の統計処理には Statistical Analysis System (SAS) を用いて算出した。各測定値の重症度別の検討に際しては、分散分析を行った後、群間に有意差 ( $p < 0.05$ ) のあったものに対しては Duncan の方法にて多重比較を行い、 $p < 0.05$  のものを有意差有りとした。また、IL-2, IFN- $\alpha$  処理の前後での <sup>51</sup>CrRCA および SCA の測定値の比較には paired t-test を行い、相関係数の検討には Pearson の相関係数を求めた。

### 成 績

#### I. <sup>51</sup>CrRCA

図1は% specific <sup>51</sup>Cr release を示す。健常児の% specific <sup>51</sup>Cr release は  $16.4 \pm 1.4\%$  (mean  $\pm$  SEM) であった。AD 患者では軽症群  $16.5 \pm 2.3\%$ 、中等症群  $19.3 \pm 1.7\%$  で、ともに健常児との間に有意な差は認められなかったが、重症群では  $10.4 \pm 1.4\%$  で、健

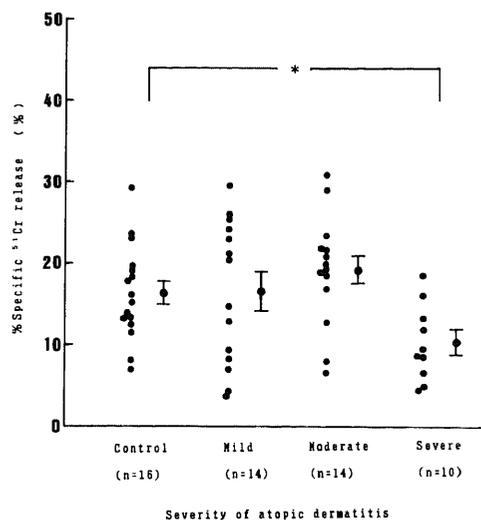


Fig. 1. Relationship between % specific <sup>51</sup>Cr release and severity of atopic dermatitis. Each bar represents mean  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$  by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison.

常見に比べ有意に低下していた ( $p < 0.05$ ).

II. SCA

図2, 図3および図4は SCA の測定値を示す. 健常見の% conjugate, % lytic conjugate および% NK はそれぞれ  $10.6 \pm 0.2\%$ ,  $23.8 \pm 0.7\%$ ,  $2.5 \pm 0.1\%$  であった. AD 患者の軽症群および中等症群と健常見との間に有意な差は認められなかったが, 重症群では% conjugate, % lytic conjugate および% NK はそれぞれ  $8.3 \pm 0.4\%$ ,  $19.6 \pm 0.7\%$ ,  $1.6 \pm 0.1\%$  で, いずれも健常見に比べ有意に低下していた (いずれも  $p < 0.05$ ).

III. IL-2, IFN- $\alpha$  処理後の  $^{51}\text{CrRCA}$  および SCA

表1, 表2はそれぞれ IL-2, IFN- $\alpha$  処理後の  $^{51}\text{CrRCA}$  と SCA の測定値を示す.

健常見では% specific  $^{51}\text{Cr}$  release は IL-2 あるいは IFN- $\alpha$  の処理によって有意に増強し (それぞれ  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ), しかも IL-2 と IFN- $\alpha$  を同時に用

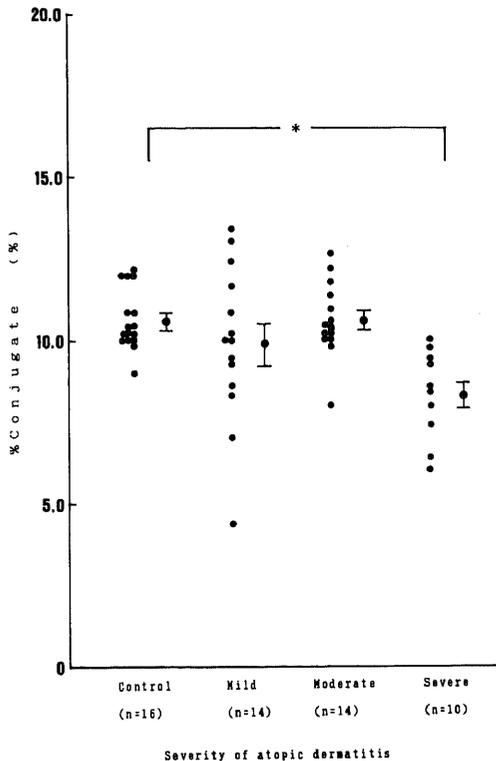


Fig.2. Relationship between % conjugate in single cell assay and severity of atopic dermatitis. Each bar represents mean  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$  by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison.

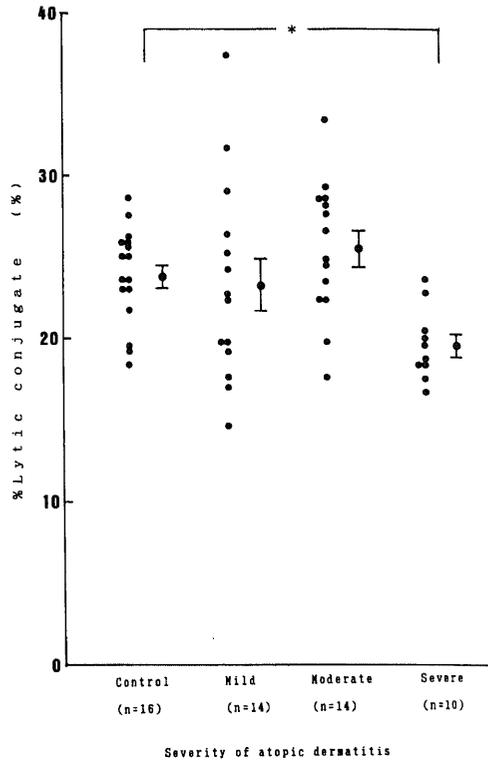


Fig.3. Relationship between % lytic conjugate in single cell assay and severity of atopic dermatitis. Each bar represents mean  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$  by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison.

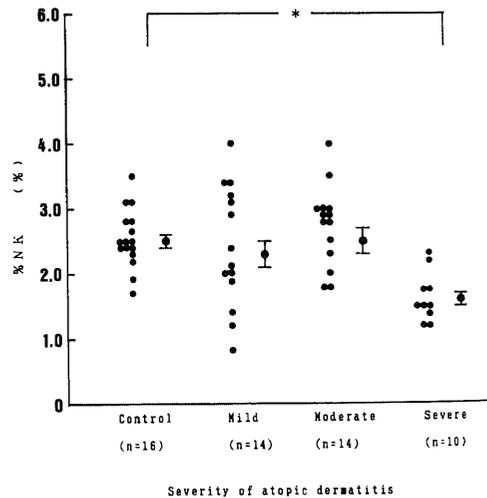


Fig.4. Relationship between % NK in single cell assay and severity of atopic dermatitis. Each bar represents mean  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$  by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison.

いて処理した場合は、各々単独で処理した場合に比べ有意に増強した(それぞれ  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ). また、% lytic conjugate および % NK は IL-2 と IFN- $\alpha$  の同時処理によって有意に増強したが(いずれも  $p < 0.001$ ), % conjugate では有意な増強は認められなかった。

他方、AD 患者では重症群で IFN- $\alpha$  処理による % specific  $^{51}\text{Cr}$  release の増強は認められなかったが、軽症群および中等症群では健常児と同様に、% specific  $^{51}\text{Cr}$  release は IL-2 と IFN- $\alpha$  の単独処理および同時処理によって有意に増強した。また、SCA は軽症から重症までいずれの群も IL-2 と IFN- $\alpha$  の同時処理によって有意に増強した。

IV. Leu-7 陽性細胞および Leu-11c 陽性細胞

図 5、図 6 はそれぞれ Leu-7 陽性細胞と Leu-11c 陽性細胞のポピュレーションを示す。健常児の Leu-7 陽

性細胞および Leu-11c 陽性細胞はそれぞれ  $11.5 \pm 1.8\%$ ,  $12.9 \pm 1.5\%$  であった。AD 患者では Leu-7 陽性細胞は軽症から重症までいずれの群でも健常児との間に有意な差は認められなかった。これに対して、Leu-11c 陽性細胞は軽症群および重症群では健常児との間に有意な差は認められなかったが、中等症群では  $20.7 \pm 1.9\%$  で、健常児に比べ有意に増加していた ( $p < 0.05$ ).

V. % specific  $^{51}\text{Cr}$  release と SCA の相関

表 3 は % specific  $^{51}\text{Cr}$  release と SCA との間の相関係数を示す。健常児では % specific  $^{51}\text{Cr}$  release と % conjugate, % lytic conjugate および % NK との間にはいずれも有意な正の相関関係が認められた(それぞれ  $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ). また、AD 患者でも軽症から重症までいずれの群も健常児と同様に、有意な正の相関関係が認められた。一方、

Table 1. Effect of IL-2 and/or IFN- $\alpha$  on % specific  $^{51}\text{Cr}$  release in the controls and the atopic dermatitis patients

Severity	No treatment	IL-2	IFN- $\alpha$	IL-2+IFN- $\alpha$
Control (n=16)	16.4 $\pm$ 1.4 %	23.1 $\pm$ 2.3 % A***, B*	18.3 $\pm$ 1.7 % A**, B***	25.4 $\pm$ 2.1 %
Mild (n=14)	16.5 $\pm$ 2.3	21.7 $\pm$ 3.0 A***, B**	18.9 $\pm$ 2.8 A*, B***	23.9 $\pm$ 3.3
Moderate (n=14)	19.3 $\pm$ 1.7	27.3 $\pm$ 2.1 A***	21.7 $\pm$ 1.7 A**, B***	27.5 $\pm$ 2.1
Severe (n=10)	10.4 $\pm$ 1.4 C*	14.8 $\pm$ 2.3 A**, C*	11.9 $\pm$ 2.0 B**, C*	15.7 $\pm$ 2.6 C*

Each value represents mean $\pm$ SEM.

A, the comparison with % specific  $^{51}\text{Cr}$  release with no treatment in same severity by paired t-test; B, the comparison with % specific  $^{51}\text{Cr}$  release with both IL-2 and IFN- $\alpha$  in same severity by paired t-test; C, the comparison with % specific  $^{51}\text{Cr}$  release in the controls with same treatment by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

Table 2. Effect of both IL-2 and IFN- $\alpha$  on single cell assay in the controls and the atopic dermatitis patients

Severity	% Conjugate (%)		% Lytic conjugate (%)		% NK (%)	
	No treatment	IL-2+IFN- $\alpha$	No treatment	IL-2+IFN- $\alpha$	No treatment	IL-2+IFN- $\alpha$
Control (n=16)						
Mild (n=14)	$\left[ \begin{array}{cc} 10.6 \pm 0.2 & 11.4 \pm 0.2 \\ \text{A*} \end{array} \right]$		$\left[ \begin{array}{cc} 23.8 \pm 0.7 & 28.4 \pm 0.8 \\ \text{A***} \\ 23.3 \pm 1.6 & 26.3 \pm 1.6 \\ \text{A**} \end{array} \right]$		$\left[ \begin{array}{cc} 2.5 \pm 0.1 & 3.1 \pm 0.1 \\ \text{A***} \\ 2.3 \pm 0.2 & 2.9 \pm 0.3 \\ \text{A***} \end{array} \right]$	
Moderate (n=14)	$\left[ \begin{array}{cc} 10.6 \pm 0.3 & 11.4 \pm 0.2 \\ \text{A*} \end{array} \right]$		$\left[ \begin{array}{cc} 25.5 \pm 1.1 & 28.5 \pm 1.0 \\ \text{A**} \end{array} \right]$		$\left[ \begin{array}{cc} 2.5 \pm 0.2 & 3.3 \pm 0.1 \\ \text{A***} \end{array} \right]$	
Severe (n=10)	$\left[ \begin{array}{cc} 8.3 \pm 0.4 & 9.4 \pm 0.5 \\ \text{A**} \end{array} \right]$		$\left[ \begin{array}{cc} 19.6 \pm 0.7 & 21.9 \pm 1.2 \\ \text{A*} \end{array} \right]$		$\left[ \begin{array}{cc} 1.6 \pm 0.1 & 2.1 \pm 0.2 \\ \text{A**} \end{array} \right]$	

Each value represents mean $\pm$ SEM.

A, the comparison by paired t-test; B, the comparison by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

IL-2, IFN- $\alpha$  処理を加えた場合も同様に, 健常児, AD 患者とも % specific  $^{51}\text{Cr}$  release と SCA との間に有意な正の相関関係が認められた.

VI. % specific  $^{51}\text{Cr}$  release と Leu-7 陽性細胞および Leu-11c 陽性細胞の相関

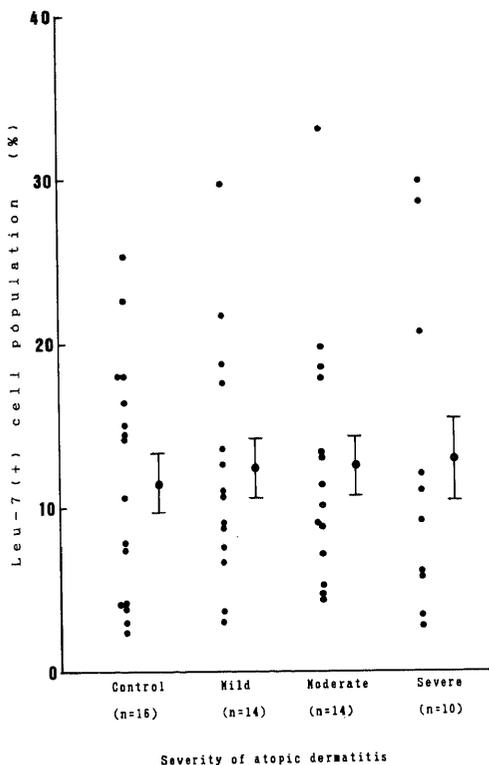


Fig. 5. Relationship between Leu-7 (+) cell population and severity of atopic dermatitis. Each bar represents mean  $\pm$  SEM.

表 4 は % specific  $^{51}\text{Cr}$  release と Leu-7 陽性細胞および Leu-11c 陽性細胞のポピュレーションとの間の相関係数を示す. 健常児では % specific  $^{51}\text{Cr}$  release

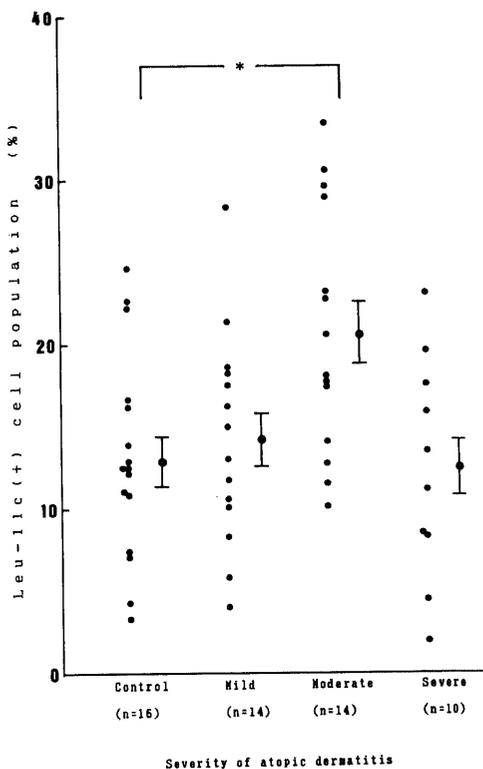


Fig. 6. Relationship between Leu-11c (+) cell population and severity of atopic dermatitis. Each bar represents mean  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$  by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison.

Table 3. Correlation coefficients between % specific  $^{51}\text{Cr}$  release and single cell assay in the controls and the atopic dermatitis patients

Severity	No treatment			IL-2+IFN- $\alpha$		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Control (n=16)	*** 0.765	* 0.578	*** 0.821	*** 0.767	** 0.708	*** 0.884
Mild (n=14)	** 0.739	** 0.666	*** 0.906	*** 0.849	** 0.725	*** 0.955
Moderate (n=14)	* 0.636	** 0.699	*** 0.810	** 0.687	** 0.738	*** 0.844
Severe (n=10)	** 0.765	* 0.743	*** 0.918	** 0.829	** 0.846	*** 0.957

R<sub>1</sub>, correlation coefficient between % specific  $^{51}\text{Cr}$  release and % conjugate; R<sub>2</sub>, correlation coefficient between % specific  $^{51}\text{Cr}$  release and % lytic conjugate; R<sub>3</sub>, correlation coefficient between % specific  $^{51}\text{Cr}$  release and % NK; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

と Leu-11c 陽性細胞との間に有意な正の相関関係が認められたが ( $p < 0.05$ ), Leu-7 陽性細胞との間には有意な相関関係は認められなかった. また, AD 患者でも, 健常児と同様に, % specific  $^{51}\text{Cr}$  release と Leu-11c 陽性細胞の間に有意な正の相関関係が認められた (いずれも  $p < 0.05$ ).

### 考 察

NK 細胞活性は副腎皮質ホルモンの全身投与を含む多くの因子により影響されることが既に報告されている<sup>22)29)</sup>. そこで, 本研究では NK 細胞活性に影響を与える可能性のある副腎皮質ホルモンの全身投与を受けていたものは対象から除外した. しかし, 対象患者の多くは副腎皮質ホルモンの局所投与および抗ヒスタミン剤の全身投与を受けていたので, これらの治療が NK 細胞活性に与える影響を予め検討した. その結果, 副腎皮質ホルモンの外用や抗ヒスタミン剤の内服による治療を受けていた患者群と治療を受けていなかった患者群の間で NK 細胞活性に有意な差は認められなかった.

これまで AD 患者における NK 細胞活性は主に  $^{51}\text{CrRCA}$  により検討されてきたが, それによる知見には議論が多い. Viander ら<sup>24)</sup>は, 成人の AD 患者を対象として検索し, 患者群と対照群の間に NK 細胞活性の差異は認められなかったと報告している. これに対して, 成人患者について検索した Kusaimi ら<sup>25)</sup>やその他の人達<sup>26)~31)</sup>, および小児患者について検索した Chiarelli ら<sup>32)</sup>はいずれも AD 患者では NK 細胞活性の低下が認められたと報告している. また Chiarelli

ら<sup>32)</sup>は, AD 患者における NK 細胞活性の低下は AD の重症度と負の相関関係があるが, 皮疹が軽快した後も NK 細胞活性の低下が続くことから, 背景に何らかの免疫学的異常があるのではないかと述べている.

著者の成績では,  $^{51}\text{CrRCA}$  による NK 細胞活性は対照群と比べて軽症群および中等症群ではほぼ同様であったが, 重症群では有意に低下していることが示された. また, 重症患者で % specific  $^{51}\text{Cr}$  release は IL-2 により有意に増強されたが, IFN- $\alpha$  による増強は認められなかった. IL-2 および IFN- $\alpha$  はいずれも

NK 細胞活性化因子として NK 細胞の分化と増殖に関与しているが, 両者の作用機序には若干の相違があるとされているので<sup>23)33)34)</sup>, 上述のような重症の AD 患者におけるこの 2つのリンフォカインに対する反応性の違いも両者の作用機序の相違によるものと思われる.

約10年前 Grimm ら<sup>19)</sup>によって開発された SCA は, NK 細胞の細胞傷害能力を単一細胞レベルでとらえ得るという利点を有する. NK 細胞は recycling 能力, すなわち, まず1つの標的細胞を認識し, 結合し, 傷害したのち, さらに別の標的細胞へと移動して同様の傷害を繰り返す能力を有するが, SCA では NK 細胞をアガロース内に封入するので, この recycling を阻止して単一細胞としての機能をみるのが可能である. しかも, 標的細胞と結合する能力と標的細胞を傷害する能力を別々にみることも可能である.

これまで NK 細胞活性を SCA を用いて検討した報告は少なく<sup>19)~20)</sup>, しかも測定条件によって測定値に若干の相違があるので, 本研究で得られた健常児の測定値を比較することは難しいが, 本研究の測定条件の参考にした内田<sup>20)</sup>の報告と比較すると, 健常児での測定値はこの報告における健常人での測定値にほぼ一致していた.

AD 患者における SCA に関する研究はさらに少く, Jensen<sup>18)</sup>の報告のみである. しかし, これも成人の AD 患者が対象で, 小児の AD 患者を対象とした報告はまだない. Jensen<sup>18)</sup>によると, 健常成人に比べて中等症ないし重症の AD 患者では % conjugate, % lytic conjugate および % NK がいずれも有意に低下していたという. 著者の成績では, 健常児に比べて重症の AD 患者で % conjugate, % lytic conjugate および % NK がいずれも有意に低下していた. したがって, 年齢に関係なく, 重症の AD 患者では NK 細胞活性の低下があり, それは標的細胞との結合能力の低

Table 4. Correlation coefficients between % specific  $^{51}\text{Cr}$  release and NK cell surface markers in the controls and the atopic dermatitis patients

Severity	R <sub>7</sub>	R <sub>11c</sub>
Control (n=16)	0.244	* 0.599
Mild (n=14)	0.436	* 0.660
Moderate (n=14)	0.468	* 0.628
Severe (n=10)	0.380	* 0.688

R<sub>7</sub>, correlation coefficient between % specific  $^{51}\text{Cr}$  release and Leu-7(+) cell population; R<sub>11c</sub>, correlation coefficient between % specific  $^{51}\text{Cr}$  release and Leu-11c(+) cell population; \*,  $p < 0.05$ .

下および細胞傷害能力の低下によるものと考えられた。

また、著者は IL-2, IFN- $\alpha$  処理を加えた場合の SCA も同時に測定した。その結果、健常児では % lytic conjugate および % NK は増強されたが、% conjugate の増強は認められなかった。このことは、健常児では IL-2 や IFN- $\alpha$  のリンフォカインが NK 細胞の標的細胞結合能力よりもむしろ標的細胞傷害能力を増強することを示している。一方、AD 患者では、IL-2, IFN- $\alpha$  処理により NK 細胞の標的細胞結合能力だけでなく標的細胞傷害能力も増強されることが示された。また、AD 患者におけるリンフォカインに対する反応性の亢進は、どの重症度群にも共通して認められ、重症群ではリンフォカインにより NK 細胞活性の低下が正常レベルに回復することから、このような機構が生体内では NK 細胞の機能低下に対する機能的適応として働いている可能性がある。今後、AD 患者の NK 細胞機能をより詳細に解明するためには、NK-リンフォカイン系として NK 細胞をとらえることが重要と思われる。

$^{51}\text{Cr}$ RCA および SCA による NK 細胞の機能的解析に加えて、NK 細胞表面マーカーによる数量的解析も行った。用いられたモノクローナル抗 Leu-7 抗体は T 細胞と、抗 Leu-11c 抗体はミエロイド系細胞と交叉反応を示すことが知られているが<sup>14)15)35)</sup>、一般にこれらの抗体は NK 細胞のほぼ特異的なマーカーとして利用されている。従来、健常児では Leu-11c 陽性細胞は出生後ほぼ一定であるが、Leu-7 陽性細胞は出生時には少なく、加齢とともに増加することが報告されている<sup>35)36)</sup>。本研究における健常児の Leu-7 陽性細胞および Leu-11c 陽性細胞のポピュレーションはいずれもこれまでの報告<sup>35)36)</sup>における 9~15歳の正常値とほぼ一致していた。また、AD 患者では中等症群において Leu-11c 陽性細胞が有意に増加していた。このこととこの群の患者の NK 細胞活性が正常であることを併せて考えると、中等症の患者で個々の Leu-11c 陽性 NK 細胞の活性が低下している可能性が推測された。

一方、Leu-11c 陽性細胞は NK 細胞活性との間に正の相関関係がみられたが、Leu-7 陽性細胞と NK 細胞活性との間には正の相関関係は認められなかったので、Leu-7 陽性細胞より Leu-11c 陽性細胞の方が NK 細胞のポピュレーションを反映するものと考えられた。しかしこれに対して、Nomiyama ら<sup>30)</sup>は成人 AD 患者で Leu-7 陽性細胞および Leu-11c 陽性細胞がいずれも減少し、しかもともに NK 細胞活性との間に正の相関関係を示すことを認め、AD 患者の NK 細胞

活性の低下は Leu-7 陽性細胞および Leu-11c 陽性細胞の減少によると述べている。このような差異を生じた理由として、対象患者の年齢の差異が考えられるが、明らかでない。

以上のように、著者は 3 種の解析方法を用いて小児の AD 患者における NK 細胞の免疫学的特徴を多角的に解析した。その成績の要約と解釈は次のようである。軽症の AD 患者では健常児との間に NK 細胞の機能的・数量的な差異は認められなかった。重症の AD 患者では NK 細胞は数量的には正常であるが、NK 細胞の標的細胞結合能力および標的細胞傷害能力が低下し、その結果 % specific  $^{51}\text{Cr}$  release が低下していた。中等症の AD 患者では Leu-11c 陽性 NK 細胞が増加したが、NK 細胞活性は健常児との間に差は認められなかった。これは健常児に比べ個々の NK 細胞の活性が低下しているためで、さらに言及するならば、NK 細胞の増加によって個々の NK 細胞の機能低下が補償されていると考えられる。

本研究では 9~15歳の小児 AD 患者を対象として選び、重症度別に分類し、NK 細胞の免疫学的特徴を横断的にとらえた。今後さらに、この特徴の推移を縦断的に追跡できれば、各患者における NK 細胞機能の測定はその患者の重症度を客観的に把握し、さらに予後を推測するための補助的手段として役立つであろう。

## 結 論

アトピー性皮膚炎患者 39 人、健常児 16 人について、 $^{51}\text{Cr}$ RCA, SCA およびモノクローナル抗体による NK 細胞表面マーカー解析を行い、以下の結果を得た。

1. アトピー性皮膚炎患者の % specific  $^{51}\text{Cr}$  release は軽症群および中等症群では健常児との間に有意差は認められなかったが、重症群で健常児に比べ有意に低下していた。

2. アトピー性皮膚炎患者の SCA は軽症群および中等症群では健常児との間に有意差は認められなかったが、重症群では % conjugate, % lytic conjugate および % NK のいずれも健常児に比べ有意に低下していた。

3. アトピー性皮膚炎患者の % specific  $^{51}\text{Cr}$  release は重症群で IFN- $\alpha$  による増強は認められなかったが、軽症群および中等症群では IL-2, IFN- $\alpha$  によって有意に増強された。また、SCA は軽症から重症までいずれの群でも IL-2, IFN- $\alpha$  によって有意に増強された。

4. アトピー性皮膚炎患者の Leu-11c 陽性細胞のポピュレーションは健常児に比べ中等症群で有意に増加していたが、軽症群および重症群では健常児との間に有意差は認められなかった。また、Leu-7 陽性細胞のポピュレーションは健常児との間に有意差は認められなかった。

5. アトピー性皮膚炎患者および健常児において、% specific  $^{51}\text{Cr}$  release は SCA および Leu-11c 陽性細胞との間に有意な正の相関関係が認められたが、Leu-7 陽性細胞との間には有意な相関関係は認められなかった。

以上、9~15歳の小児アトピー性皮膚炎患者におけるNK細胞の免疫学的特徴は重症度により異なり、重症患者ではNK細胞の標的細胞結合能力および標的細胞傷害能力が低下し、中等症患者では機能の低下したNK細胞が数量的に増加していた。

#### 謝 辞

稿を終るに臨み、終始御指導、御校閲を頂いた恩師岡田晃教授ならびに広根孝衛教授に深謝の意を表します。また、御指導頂いた窪田道男博士（東北歯科大学）に厚く御礼申し上げます。さらに、試料を提供して下さいました川島愛雄博士（石川県立中央病院）、川原繁博士（氷見市民病院）ならびに今井敏雄先生（公立加賀中央病院）に心から感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 米沢郁雄, 今村貞夫, 荻野篤彦, 高橋千恵, 滝川雅浩: 伝染性膿痂疹の統計的観察. 皮紀要, **69**, 71-75 (1974).
- 2) 今村貞夫, 米沢郁雄, 堀尾 武: 伝染性軟属腫の統計的観察. 皮紀要, **70**, 49-54 (1975).
- 3) Currie, J. M., Wright, R. C. & Miller, O.: The frequency of warts in atopic patients. *Cutis*, **8**, 243-244 (1971).
- 4) Rajka, G.: *Atopic Dermatitis*, 1st ed., p19-21, W. B. Saunders Co., Ltd., London, 1975.
- 5) Uehara, M.: Atopic dermatitis and tuberculin reactivity. *Arch. Dermatol.*, **113**, 1226-1228 (1977).
- 6) McGeady, S. J. & Buckley, R. H.: Depression of cell-mediated immunity in atopic eczema. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **56**, 393-406 (1975).
- 7) Strannegard, I. L., Lindholm, L. & Strannegard, Ö.: T lymphocytes in atopic children. *Int. Archs Allergy Appl. Immunol.*, **50**, 684-692 (1976).
- 8) Valverde, E., Vich, J. M., Huguet, J., García-calderón, J. V. & García-calderón, P. A.: An in vitro study of lymphocytes in patients with atopic dermatitis. *Clinical Allergy*, **13**, 81-88 (1983).
- 9) Leung, D. Y. M., Rhodes, A. R. & Geha, R. S.: Enumeration of T cell subsets in atopic dermatitis using monoclonal antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **67**, 450-455 (1981).
- 10) Strannegard, Ö., Strannegard, I. L., Kang, K., Cooper, K. D. & Hanifin, J. M.: FcIgG receptor-bearing lymphocytes and monoclonal antibody-defined T cell subsets in atopic dermatitis: Effect of treatment with thymopoietin pentapeptide (TP-5). *Int. Archs Allergy Appl. Immunol.*, **69**, 238-244 (1982).
- 11) 狩野庄吾: NK 細胞活性. 臨床免疫, **13** (Suppl. 3), 361-365 (1981).
- 12) 押味和夫: NK 細胞活性の検査. 臨床病理, **45**, 299-309 (1981).
- 13) Lanier, L. L., Le, A. M., Phillips, J. H., Warner, N. L. & Babcock, G. F.: Subpopulations 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).
- 14) 安保 徹: NK 細胞のマーカー. 代謝, **20**, 1423-1430 (1983).
- 15) 安保 徹: モノクローナル抗体を用いたヒトNK細胞の解析. 最新医学, **39**, 51-55 (1984).
- 16) Grimm, E. & Bonavida, B.: Mechanism of cell-mediated cytotoxicity at the single cell level. *J. Immunol.*, **123**, 2861-2869 (1979).
- 17) Targan, S., Grimm, E. & Bonavida, B.: A single cell marker of active NK cytotoxicity: only a fraction of target binding lymphocytes are killer cells. *J. Clin. Lab. Immunol.*, **4**, 165-168 (1980).
- 18) Jensen, J. R.: Reduction of active natural killer cells in patients with atopic dermatitis estimated at the single cell level. *Acta. Derm. Venereol. (Stockh.) Suppl.* **114**, 105-108 (1985).
- 19) 上原良雄, 山田幸宏, 川 茂幸, 松葉喬久, 宮川幸昭: single cell mediated cytotoxicity 法による Natural killer 及び Interleukin2-induced Natural killer-like cells の細胞数の測定 1. 基礎的検討. 臨床免疫, **15**, 228-235 (1983).
- 20) 内田温士: NK 細胞の Single Cell Assay. 臨床免疫, **19** (Suppl. 12), 257-262 (1987).

- 21) 上原正巳, 太藤重夫: アトピー性皮膚炎. 現代皮膚科学体系第13巻, 第1版, 89-119頁, 中山書店, 東京, 1980.
- 22) 押味和夫, 権田信之, 隅谷護人, 狩野庄吾, 高久史麿: ヒト Natural killer 細胞活性測定上の問題点. 臨床免疫, 11, 73-78 (1979).
- 23) 湊 長博: NK 活性発現に影響する諸因子. 臨床免疫, 16, 382-391 (1984).
- 24) Viander, M., Uksila, J., Lassila, O. & Jansén, C. T.: Natural killer cell activity in atopic dermatitis. Arch. Dermatol. Res., 274, 283-288 (1982).
- 25) Kusaimi, N. T. & Trentin, J. J.: Natural cell-mediated cytotoxic activity in the peripheral blood of patients with atopic dermatitis. Arch. Dermatol., 118, 568-571 (1982).
- 26) Lever, R. S., Lesko, M. J., Mackie, R. M. & Parrott, D. M. V.: Natural-killer-cell activity in atopic dermatitis. Clinical Allergy, 14, 483-490 (1984).
- 27) Jensen, J. R., Sand, T. T., Jørgensen, A. S. & Pedersen, K. T.: Modulation of natural killer cell activity in patients with atopic dermatitis. J. Invest. Dermatol., 82, 30-34 (1984).
- 28) Lever, R. S., Lesko, M. J., Mackie, R. M. & Parrott, D. M. V.: Natural killer cell activity in atopic dermatitis: a sequential study. Clinical Allergy, 15, 479-486 (1985).
- 29) Larsen, F. S., Jørgensen, A. S. & Grunnet, N.: Natural killer cell function in atopic dermatitis. Clin. Exp. Dermatol., 10, 104-110 (1985).
- 30) Hall, T. J., Rycroft, R. & Brostoff, J.: Decreased natural killer cell activity in atopic eczema. Immunology, 56, 337-344 (1985).
- 31) Nomiyama, K., Yamashita, U., Nakamura, H., Suenaga, Y. & Nishio, K.: Natural killer (NK) cell activity and NK-related cell surface markers in patients with atopic dermatitis. J. Dermatol., 15, 241-247 (1988).
- 32) Chiarelli, F., Canfora, G., Verrotti, A., Amerio, P. & Morgese, G.: Natural killer cell function in atopic dermatitis. Acta. Paediatr. Scand., 77, 275-278 (1988).
- 33) 熊谷勝男, 伊藤恭悟: NK 細胞とインターフェロン. Immunohaematology, 3, 38-44 (1981).
- 34) 熊谷勝男: IL-2 とインターフェロンによるキラー細胞の増強. 医学の歩み, 126, 401-408 (1983).
- 35) 関 秀俊, 谷口 昂: ヒト NK 細胞の分化と成熟. 小児医学, 20, 403-416 (1987).
- 36) Abo, T., Cooper, M. D. & Balch, C. M.: Postnatal expansion of the natural killer and killer cell population in humans identified by the monoclonal HNK-1 antibody. J. Exp. Med., 155, 321-326 (1982).

**Studies on Natural Killer Cell Activity and Natural Killer Cell Surface Markers in Children with Atopic Dermatitis** Satoru Kimura, Department of Public Health, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 98, 279—289 (1989)

**Key words** atopic dermatitis, natural killer cell,  $^{51}\text{Cr}$  release cytotoxic assay, single cell assay, surface marker

#### Abstract

The present study was pursued to evaluate the immunological characteristics of the natural killer (NK) cell in children with atopic dermatitis (AD). The subjects used in this study were as follows: 1) thirty-nine patients (19 males and 20 females) with AD, aged 9 to 15 years (mean age 11.9 years), 2) sixteen medically healthy children (9 males and 7 females) as the controls, aged 9 to 15. The AD patients were classified into three grades according to the severity of AD: mild (14 children), moderate (15 children), severe (10 children). Both the NK cell activity by  $^{51}\text{Cr}$  release cytotoxic assay and that by single cell assay were significantly reduced in severe AD compared with the controls. Except for the enhancement of % specific  $^{51}\text{Cr}$  release in severe AD by  $\text{IFN-}\alpha$ , the NK cell activities were significantly enhanced by IL-2 and/or  $\text{IFN-}\alpha$  in the AD patients. Although Leu-7 (+) cell population was not significantly different in the AD patients compared with the controls, Leu-11c (+) cell population was significantly higher in moderate AD than in the controls. And % specific  $^{51}\text{Cr}$  release was significantly correlated both with single cell assay and with Leu-11c (+) cell population in both the AD patients and the controls. Thus these results indicated that the ability of the NK cell to conjugate and to kill the target cell was depressed in severe AD and that the NK cell function was depressed and the NK cells quantitatively increased in moderate AD. The immunological characteristics of the NK cell in children with AD could be clarified in each severity by cross-sectional study. Furthermore, if the changes of these characteristics can be followed up in a longitudinal study, there will raise the possibility that measurement of the NK cell function in childhood may become an aid to objectively recognize the severity of AD and to predict the prognosis.