

## 原著 血液透析患者のナチュラルキラー細胞に対するC型肝炎ウイルス感染の影響について

著者	昆 吏規, 椎名 正明, 大高 徹也, 大橋 洋一, 佐藤 孝臣, 佐藤 寿伸, 小林 光樹
雑誌名	東北大学医学部保健学科紀要
巻	18
号	1
ページ	15-22
発行年	2009-01
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/44352">http://hdl.handle.net/10097/44352</a>

## 血液透析患者のナチュラルキラー細胞に対する C型肝炎ウイルス感染の影響について

昆 吏規<sup>1</sup>, 椎名正明<sup>2</sup>, 大高徹也<sup>3,4</sup>, 大橋洋一<sup>4</sup>,  
佐藤孝臣<sup>5</sup>, 佐藤寿伸<sup>6</sup>, 小林光樹<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東北大学大学院医学系研究科 保健学専攻 がん看護学

<sup>2</sup>東北大学大学院医学系研究科 消化器病態学

<sup>3</sup>東北大学大学院医学系研究科 保健学専攻 検査技術科学コース

<sup>4</sup>公立刈田総合病院

<sup>5</sup>宏人会木町病院

<sup>6</sup>東北大学附属病院 血液浄化療法部

## Evaluation of Natural Killer Cells in Hemodialysis Patients with Hepatitis C Virus Infection

Satonori KON<sup>1</sup>, Masaaki SHIINA<sup>2</sup>, Tetsuya OOTAKA<sup>3,4</sup>, Yoichi OHASHI<sup>4</sup>,  
Takaomi SATO<sup>5</sup>, Toshinobu SATO<sup>6</sup> and Koju KOBAYASHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oncology Nursing, Tohoku University Graduate School of Medicine

<sup>2</sup>Department of Gastroenterology, Tohoku University Graduate School of Medicine

<sup>3</sup>Course of Medical Technology, Tohoku University Graduate School of Medicine

<sup>4</sup>Katia General Hospital

<sup>5</sup>Kojinkai Kimachi Hospital

<sup>6</sup>Department of Hemodialysis, Tohoku University Hospital

Key words : hepatitis C virus, natural killer cell, hemodialysis, cytokine, flow cytometry

High incidence of tuberculosis and malignancies in hemodialysis patients suggests the disturbance of cellular immunity in these patients. The high prevalence of hepatitis C virus infection has also been reported in hemodialysis units. In this report, we evaluate natural killer cells in hemodialysis patients with hepatitis C virus infection. Nine hemodialysis patients were included in this study ; 5 were hepatitis C virus RNA positive (mean age, 50.4 years) and 4 patients were negative for hepatitis C virus RNA (mean age, 65.0 years). Natural killer cells were detected by flow cytometry after staining with fluorescence conjugated monoclonal antibodies (anti-CD3 and anti-CD56). Populations of total CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> in lymphocyte fraction were 17.5±11.0%, 15.5±10.8% in hepatitis C virus-positive patients, and they were significantly lower than those in uninfected patients (35.0±14.0% and 34.3±14.2%). However, there was no statistical difference in CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> population between the groups. Up-regulation of CD69 expression after stimulation with anti-CD16 was observed and there was no statistical difference between the two groups.

Cytokine production after anti-CD16 stimulation was not statistically different between the two groups. In conclusion, although hepatitis C virus infection may affect natural killer cell population in hemodialysis patients, the functions of natural killer cells as evaluated by the activation and cytokine production were well maintained in patients with hepatitis C virus infection.

## はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) は、主に血液を介して伝播する RNA ウィルスである。HCV は肝細胞と一部のリンパ球を標的細胞とし、宿主の免疫機構やインターフェロン (IFN) からエスケープして持続感染を引き起こす。また、ヒトの肝臓に感染すると、70-80% と高率に持続感染へと移行する。これにより引き起こされるのが、C型慢性肝炎である。また、C型慢性肝炎の30-60% は肝硬変、肝癌に進行する。

血液透析患者は、健常人と比較してその細胞性免疫能が低下し、発癌率や結核罹患率が高いことが報告されている<sup>1)</sup>。また、血液透析患者の10-20% は、HCV 感染が血清学的に証明されるとされている<sup>2,3)</sup>。

ナチュラルキラー (NK) 細胞は、大型顆粒リンパ球で、抗原やサイトカインなどの前感作なしに標的細胞を傷害する、自然免疫細胞である。NK 細胞の主な役割は、正常な自己の MHC を発現していない感染細胞や腫瘍細胞を認識して細胞障害をもたらすことである。最近、NK 細胞には2つの亜集団が存在し、CD56 発現強度の違いにより、CD56<sup>bright</sup>NK 細胞、CD56<sup>dim</sup>NK 細胞に分類されることが想定されるようになり、CD56<sup>bright</sup>NK 細胞は主にサイトカインを産生し、CD56<sup>dim</sup>NK 細胞は主に細胞障害性があるとされている<sup>4)</sup>。

今回、血液透析患者のNK細胞に対するC型慢性肝炎の影響について検討したので報告する。

## 対象と方法

本研究には、宮城県での2施設で血液透析を受けている慢性腎不全患者9例を対象とした。内訳は、男性:6名、女性:3名、年齢34~72歳 (平均年齢:56.9歳) であった。慢性腎不全の原疾患は慢

性糸球体腎炎6名、糖尿病性腎症1名、逆流性腎症1名、IgA腎症1名、ネフローゼ症候群1名であった。本研究は、東北大学医学部及び両施設の倫理委員会の承認を得た後に、研究に参加する各個人よりインフォームド・コンセントを得て実施した。

HCV 感染の判定は、HCV 抗体測定 (第3世代 HCV 抗体検査、ロッシュ・ダイアグノースティックス、東京) 及び HCV RNA アンプリコア定量ハイレンジ法 (ロッシュ・ダイアグノースティックス) で行い、両者ともに陽性の症例を HCV 感染者とした。

### 1) 細胞分離及び培養

採血した新鮮末梢血から Ficoll 比重遠心法により、末梢血単核球 (PBMC) を分離した。5% FBS 加 RPMI1640 培地 (GIBCO Invitrogen cell culture, 東京) を用いて、PBMC を  $2 \times 10^6$ /ml に調節し、24 穴培養プレート (BD biosciences, San Jose, CA) にて、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で16時間培養した。刺激には、抗 CD16 抗体 (BD biosciences, U.S.A.) 1 µg/ml を用いた。細胞内染色にあたっては、培養終了6時間前に1 µg/ml の GolgiPlug (BD Biosciences) を添加した。

### 2) 染色

#### 表面染色

$5 \times 10^5$  cells の PBMC を遠心洗浄 (300 × g, 6 分間) し、染色バッファー (0.1% ウシ血清アルブミン添加リン酸緩衝液) に懸濁させ、FITC 標識-抗 CD3 抗体 (BD Biosciences)、APC 標識-抗 CD56 抗体 (Miltenyi Biotec, Germany)、PE 標識-抗 CD69 抗体 (BD Biosciences) を添加し、よく混和した後、氷上遮光で30分インキュベートした。染色バッファーにて遠心洗浄した後、1% パラホルムアルデヒドで固定した。

細胞内染色

培養した PBMC を遠心洗浄し、Per CP 標識-抗 CD3 抗体、APC 標識-抗 CD56 抗体を添加し、よく混和した後、氷上遮光で 30 分インキュベートした。染色バッファーにて遠心洗浄した後、

Cytofix/CytoPerm 及び Perm/Wash (いずれも BD Biosciences) を用いて、細胞膜透過処理を行った。その後、PBMC を遠心洗浄後、FITC 標識-抗 IFN $\gamma$  抗体 (BD Biosciences)、PE 標識-抗 TNF $\alpha$  抗体 (BD Biosciences) を添加し、よく混和した後、氷上遮光で 30 分インキュベートした。Perm/Wash にて遠心洗浄した後、1% パラホルムアルデヒドで固定した。

3) フローサイトメーターの解析

FACS Calibur (BD Biosciences) を測定、解析に用いた。Forward scatter/Side scatter プロットにおけるリンパ球集団について、解析プロットにおける CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> を NK 細胞と定義した (図 1, a+b)。CD56 の発現強度の違いにより、発現強度の高い亜集団を CD56<sup>bright</sup> NK 細胞 (図 1, a)、低い亜集団を CD56<sup>dim</sup> NK 細胞 (図 1, b) と分類し、また、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> をナチュラルキラー T (NKT) 細胞とした (図 1, c)。NK 細胞のうち、CD69 を発現しているものを活性化 NK 細胞とした (図 2-B, d)。細胞内染色では、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> の NK 細胞における IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$  の発現を解析した (図 3 B)。アイソタイプ・コントロールとしてマウス IgG<sub>1</sub> PE、IgG<sub>2b</sub> FITC (いずれも BD Biosciences) を使用した (図 2-A、図 3-A)。

統計学的有意差の検討には、SPSS ver.17

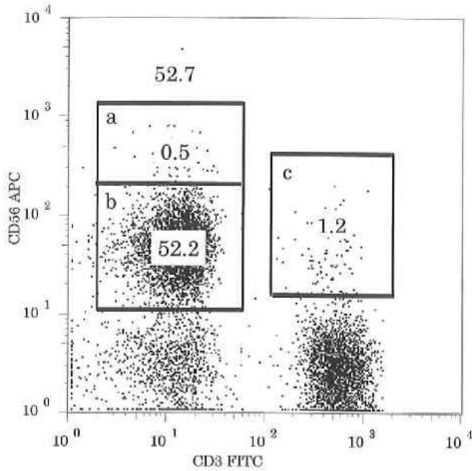


図 1. NK 細胞集団の解析  
末梢血リンパ球における代表的な CD3/CD56 の染色例。a+b の範囲を NK 細胞 (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>)、a の範囲を CD56<sup>bright</sup> NK 細胞、b の範囲を CD56<sup>dim</sup> NK 細胞として解析を行った。c の範囲を NKT 細胞 (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) として解析を行った。

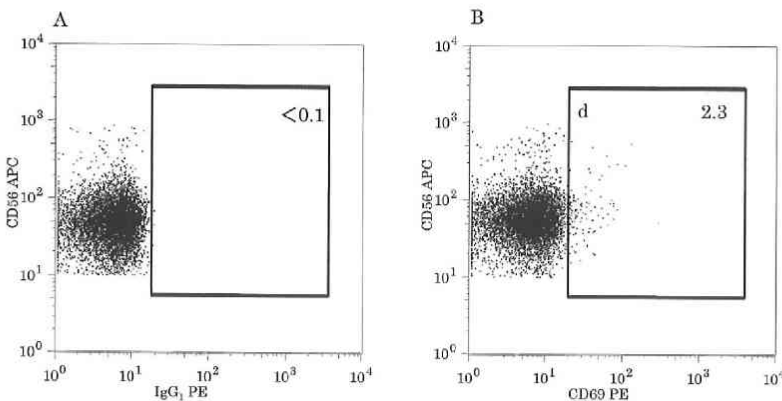


図 2. NK 細胞における CD69 発現の解析  
NK 細胞 (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) における CD69 の発現の解析結果を示す。アイソタイプ・コントロール (IgG<sub>1</sub> PE) のプロットを基に (図 2-A)、図 2-B の d のゲートを設定し、活性化 NK 細胞 (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) として解析を行った。

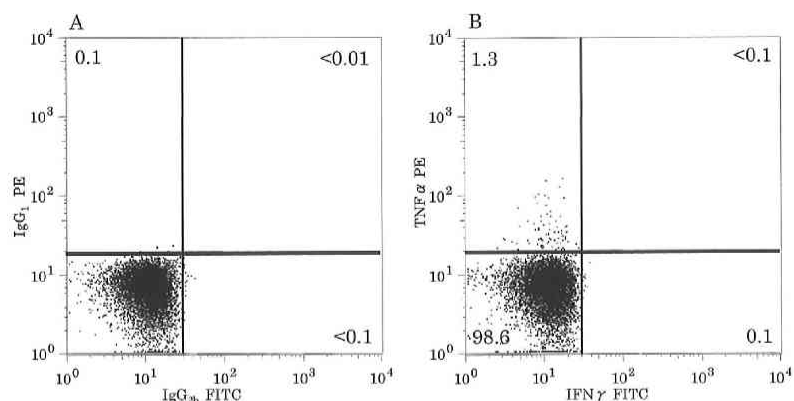


図3. 細胞内染色の解析  
 抗 CD16 抗体にて刺激培養を行った検体における NK 細胞 (CD3-CD56+) の細胞内染色例。アイソタイプ・コントロール (IgG<sub>1</sub> PE および IgG<sub>2b</sub> FITC, 図 3-A) の染色結果をもとに, 図 3-B の如くゲートを設定し IFN $\gamma$  産生と TNF $\alpha$  産生を測定した。IFN $\gamma$  産生性 NK 細胞 0.1%, TNF $\alpha$  産生性 NK 細胞 1.3%, IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$  産生性 NK 細胞 <0.1% であった。

表 1. HCV 感染群と非感染群の臨床的特徴

項目	HCV(+)	HCV(-)	統計検定 (p)
症例数	5	4	N.S.
年齢 (歳)	50.4±12.6	65.0±6.7	N.S.
性別 男性:女性	3:2	3:1	N.S.
透析期間 (月)	195.6±154.8	126.3±74.1	N.S.

N.S.: not significant

(SPSS Statistics 社, 東京)を用い,  $p < 0.05$  を統計学的有意差ありと判定した。

### 結 果

#### 1) HCV 感染群と非感染群の臨床的特徴の比較

HCV 感染群と非感染群の臨床的特徴を表 1 に示す。両群間で, 有意差が認められるものはなかったが, HCV 非感染群と比較して HCV 感染群では, 年齢が低く, 透析期間が長い傾向にあった。また, 原疾患は HCV 感染群が慢性糸球体腎炎 2 名, 糖尿病性腎症 1 名, 逆流性腎症 1 名, ネフローゼ症候群 1 名, HCV 非感染群が慢性糸球体腎炎 3 名, 糖尿病性腎症 1 名, IgA 腎症 1 名で, 2 群間に有意差は認められなかった。

#### 2) 新鮮リンパ球における NK 細胞集団の解析の比較

新鮮リンパ球の表面染色における NK 細胞集団の解析を表 2 に示す。全リンパ球中の NK 細胞比率, 全リンパ球中の CD56<sup>dim</sup>NK 細胞比率は有意差をもって, HCV 感染群が低かった。また, 全リンパ球中の CD56<sup>bright</sup>NK 細胞比率, NK 細胞中の CD56<sup>bright</sup>NK 細胞比率, NK 細胞中の CD69 陽性比率に有意差は認められないが, HCV 感染群の方が高い傾向にあった。NK 細胞中の CD56<sup>dim</sup>NK 細胞比率は, HCV 感染群の方が低い傾向にあった。

表には示していないが, 全リンパ球中の NKT 細胞比率に有意差は認められなかった。(HCV 感染群 1.7±0.8, HCV 非感染群 4.1±5.0)

## NK cells in hemodialysis patients with HCV infection

表 2. 新鮮リンパ球における NK 細胞集団の解析

測定項目	HCV (+) (%)	HCV (-) (%)	統計検定 ( <i>p</i> )
全リンパ球中の NK 細胞比率	17.5±11.0	35.0±14.0	<i>p</i> <0.05
全リンパ球中の CD56 <sup>bright</sup> NK 細胞比率	2.0±2.8	0.7±0.4	N.S.
NK 細胞中の CD56 <sup>bright</sup> NK 細胞比率	14.6±15.5	2.6±2.2	N.S.
全リンパ球中の CD56 <sup>dim</sup> NK 細胞比率	15.5±10.8	34.3±14.2	<i>p</i> <0.05
NK 細胞中の CD56 <sup>dim</sup> NK 細胞比率	85.1±15.5	97.7±2.1	N.S.
NK 細胞中の CD69 陽性比率	4.2±4.2	2.1±0.6	N.S.

N.S.: not significant

表 3. 培養後リンパ球における NK 細胞集団の解析

測定項目	刺激	HCV (+) (%)	HCV (-) (%)	統計検定 ( <i>p</i> )
全リンパ球中の NK 細胞比率	—	25.3±17.5	37.1±15.1	N.S.
	Anti-CD16	17.5±10.9	34.2±15.0	N.S.
全リンパ球中の CD56 <sup>bright</sup> NK 細胞比率	—	2.8±4.3	0.8±0.3	N.S.
	Anti-CD16	2.7±4.5	0.8±0.5	N.S.
全リンパ球中の CD56 <sup>dim</sup> NK 細胞比率	—	22.5±16.5	36.2±15.3	<i>p</i> <0.05
	Anti-CD16	14.8±8.1	34.2±15.0	N.S.
NK 細胞中の CD69 陽性比率	—	6.5±5.3	2.7±0.5	N.S.
	Anti-CD16	50.6±25.0	38.5±23.2	N.S.

\*1,\*2: *p*<0.05

N.S.: not significant

表 4. 細胞内染色を用いた NK 細胞のサイトカイン産生能の検討

測定項目	刺激	HCV (+) (%)	HCV (-) (%)	統計検定 ( <i>p</i> )
IFN $\gamma$ 産生性 NK 細胞	—	0.3±0.2	0.2±0.1	N.S.
	Anti-CD16	0.2±0.1	0.1±0.1	N.S.
TNF $\alpha$ 産生性 NK 細胞	—	1.0±0.7	0.5±0.2	N.S.
	Anti-CD16	0.7±0.3	1.1±0.6	N.S.

N.S.: not significant

## 3) 培養後リンパ球における NK 細胞集団の解析の比較

抗 CD16 抗体刺激と無刺激下で、16 時間培養後のリンパ球の表面染色における NK 細胞集団の解析を表 3 に示す。無刺激での全リンパ球中の CD56<sup>dim</sup>NK 細胞比率は、HCV 非感染群に比較して、HCV 感染群で有意に低かった。また、両群と

も、無刺激に比較して、抗 CD16 抗体刺激では NK 細胞中の CD69 陽性率は有意に高くなっていた。

## 4) NK 細胞のサイトカイン産生能の検討

刺激のもと、16 時間培養後のリンパ球の細胞内染色におけるサイトカイン産生能の検討を表 4 に示す。無刺激、抗 CD16 抗体ともに有意差は認められなかった。

## 考 察

新鮮リンパ球におけるNK細胞集団の解析においては、全リンパ球中のNK細胞比率がHCV感染群の方が有意に低かった。この結果は慢性腎不全を合併していないC型慢性肝炎症例を対象としたLinら<sup>5)</sup>の報告と同様の結果であった。また、今回の検討では、NK細胞中のCD56<sup>bright</sup>NK細胞比率がHCV感染群で高く、NK細胞中のCD56<sup>dim</sup>NK細胞比率がHCV感染群で低い傾向にあったのに対して、Linらの報告ではNK細胞中のCD56<sup>bright</sup>NK細胞比率がHCV感染群で有意に高く、NK細胞中のCD56<sup>dim</sup>NK細胞比率がHCV感染群で有意に低い結果であった。この点は今回検討した透析症例での特徴であるのか、今後の検討が必要と考えられる。また、今回の検討では、全リンパ球中のNK細胞比率は、HCV感染群、非感染群ともにLinらの研究に比較して高かったが、血液透析患者の全リンパ球中のNK細胞比率は、健常者と比較して有意に高いことが報告されており<sup>6)</sup>、このためと考えられる。また、HCV感染群、非感染群の2群間で活性化NK細胞比率に有意差は認められないが、HCV感染群の方が高い傾向にあった。しかし、従来の検討では、HCV感染群の方が活性化NK細胞は低いと報告されている<sup>5)</sup>。今回の結果は、活性化NK細胞は加齢により低下する<sup>7)</sup>ため、HCV非感染群の活性化NK細胞比率は年齢の影響を受けた可能性が考えられる。また、健常者のNK細胞中のCD56<sup>dim</sup>NK細胞比率は95.5±3.1%で、透析症例のHCV非感染群の値とほぼ同様であった。このことより、NK細胞中のCD56<sup>dim</sup>NK細胞比率が低下しているのは、透析導入によるものではなく、HCV感染によるものであると考えられる。透析患者は、輸血歴がある患者や長期透析患者がHCVに感染する比率が高いこと<sup>8)</sup>が報告されており、また、観血的な透析操作、頻回の医療行為などHCVに曝露される機会も多く、透析室内での水平感染の可能性が考えられる。

CD16は、免疫グロブリン(IgG)のFc部分と結合する、Fcレセプターであり、主に、NK細胞

活性化や抗体依存性細胞障害(ADCC)に関わっている<sup>9)</sup>。今回の検討で、抗CD16抗体刺激で16時間培養したNK細胞のCD69陽性率は、無刺激のものと比較して、HCV感染群、非感染群ともに有意に高くなっていった。しかし、抗CD16抗体刺激で16時間培養後のリンパ球におけるNK細胞集団の解析においては、すべての項目でHCV感染群、非感染群の2群間に有意差は認められなかった。また、無刺激で16時間培養後のリンパ球におけるNK細胞集団の解析においては、全リンパ球中のCD56<sup>dim</sup>NK細胞比率がHCV非感染群と比較して、HCV感染群で有意に低くなっていった。

抗CD16抗体刺激で16時間培養後、細胞内染色を用いたNK細胞のサイトカイン産生能においても、IFN $\gamma$ 産生性NK細胞及びTNF $\alpha$ 産生性NK細胞で2群間に有意差は認められなかった。CD56<sup>bright</sup>NK細胞は、CD56<sup>dim</sup>NK細胞と比較して、有意にIFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ などのサイトカインを産生する<sup>9)</sup>ことが報告されている。今回の検討において、NK細胞に占めるCD56<sup>bright</sup>NK細胞は、HCV非感染群と比較して、HCV感染群で高い傾向を示す結果であった。CD16は、CD56<sup>bright</sup>NK細胞と比較して、CD56<sup>dim</sup>NK細胞に有意に発現している<sup>10)</sup>ため、抗CD16抗体刺激によるサイトカイン産生能において、2群間に有意差が認められなかった可能性が考えられる。

## 結 語

9例の慢性血液透析患者に対して、NK細胞を測定し、以下の結果を得た。

1. 新鮮リンパ球の表面染色において、全リンパ球中のNK細胞比率、全リンパ球中のCD56<sup>dim</sup>NK細胞比率は、HCV非感染群と比較して、HCV感染群で有意に低くなっていった。

2. NK細胞中のCD69陽性率は、新鮮リンパ球及び抗CD16抗体刺激での16時間培養後もHCV感染群、非感染群の2群間に有意差は認められなかった。抗CD16抗体刺激で16時間培養した後、細胞内染色を用いたサイトカイン産生能では、HCV感染群、非感染群の2群間に有意差は認められなかった。

文 献

- 1) 吉田栄一：長期血液透析患者と悪性新生物発生に関する研究，日本臨床免疫学会誌，**9**，197-205，1986
- 2) 小林光樹，佐藤寿伸，上野義之，木村朋由：透析患者のC型肝炎感染リスクと予後に関する研究，厚生労働科学研究肝炎等克服緊急対策研究事業透析施設におけるC型肝炎院内感染の状況・予後・予防に関する研究 平成19年度総括・分担研究報告書，133-142，2008
- 3) 島田俊夫，公受伸之，村上 陽，石橋 豊：高感度心筋トロポニンTによる慢性血液透析患者の心筋障害スクリーニングとC型肝炎ウイルス感染と心・血管障害の関連について，厚生労働科学研究特定疾患対策研究事業特発性心筋症に関する調査研究班 平成14年度総括・分担研究報告書，95-98，2003
- 4) Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K.-W., Schmidt, R.E.: CD56<sup>bright</sup> cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56<sup>dim</sup> NK cells, *Eur. J. Immunol.*, **31**, 3121-3126, 2001
- 5) Lin, A.W., Gonzalez, S.A., Cunningham-Run-  
dles, S., Dorante, G., Marshall, S., Tignor, A., Ha, C., Jacobson, I.M., Talal, A.H.: CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>bright</sup> cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection, *Clin. Exp. Immunol.*, **137**, 408-416, 2004
- 6) Daichou, Y., Kurashige, S., Hashimoto, S., Suzuki, S.: Characteristic Cytokine Products of Th1 and Th2 Cells in Hemodialysis Patients, *Nephron*, **83**, 237-245, 1999
- 7) 大森景文：ヒトの natural killer cell，感染・炎症・免疫，**9**，168-174，1979
- 8) 菊池 勘，秋葉 隆，新田孝作：慢性血液透析患者におけるC型肝炎ウイルス感染のサーベイランス，東京女子医科大学雑誌，**76**，92-97，2006
- 9) Golden-Mason, L., Rosen, H.R.: Natural Killer Cells: Primary Target for Hepatitis C Virus Immune Evasion Strategies, *Liver Transplant.*, **12**, 363-372, 2006
- 10) Golden-Mason, L., Madrigal-Estebas, L., McGrath, E., Conroy, M.J., Ryan, E.J., Hegarty, J.E., O'Farrelly, C., Doherty, D.G.: Altered natural killer cell subset distribution in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure, *Gut*, **57**, 1121-1128, 2008