

原発性免疫不全症スクリーニング検査の 基礎資料としての新生児リンパ球機能

矢 田 純 一
田 中 順 子
広 川 和 憲
(東京医科歯科大学小児科)

目 的

免疫不全症はどのリンパ球レベルに欠陥が存在するかを基盤として分類整理されている。免疫機能検査法に関して、免疫グロブリンや補体などの液性免疫担当因子については年令ごとの発達の度合いについてのデータが備えられているが、免疫不全症分類上の基本となるリンパ球の機能がどのような発達の過程を経ているかの知識はきわめて乏しい。免疫不全症を早期にスクリーニングするためには各年令におけるリンパ球の機能を正確に把握しておく必要がある。その第1歩として新生児の各種リンパ球それぞれの機能についての検討を行った。

方 法

臍帯血リンパ球と成人末梢血リンパ球の機能を比較することにより相対的に新生児リンパ球の機能を評価した。

1. B 細胞 機 能

リンパ球とヒツジ赤血球とを反応させ、T細胞とヒツジ赤血球とのロゼットを形成させた後、比重遠心法にてロゼットを作ったT細胞とロゼットを作らないB細胞群とを分離した。B細胞群に含まれる表面免疫グロブリン陽性細胞の比率は30~60%で、臍帯血のものと成人のものとで大きな差をみとめなかった。

臍帯血B細胞群 2×10^5 個ないし同数の成人B細胞群 2×10^5 個に成人T細胞 2×10^5 個を加え、Pokeweed mitogen $10 \mu\text{g}$ を添加、10%胎児牛血清加培養液 RPMI 1640 1 ml に浮遊し、5% CO_2 インキュベーターにて 37°C 6日間培養、細胞塗抹標本を抗ヒト免疫グロブリン蛍光抗体で染色、免疫グロブリン産生細胞数を算出した。同一の成人T細胞により補助された臍帯血B細胞、成人B細胞それぞれから出現した免疫グロブリン産生細胞数を比較することにより臍帯血B細胞の機能を評価した。B細胞機能は成人B細胞からの免疫グロブリン産生細胞数に対する臍帯血B細胞からのものの百分率で表現した。

2. 免疫グロブリン産生におけるT細胞の補助機能

前記と同様の条件で成人B細胞 2×10^5 個に成人T細胞ないし臍帯血T細胞 2×10^5 個を加え

て培養し、それぞれから出現する免疫グロブリン産生細胞数を算定、成人T細胞を補助に使ったときに出現する免疫グロブリン産生細胞数に対する臍帯血T細胞を補助に用いたときの免疫グロブリン産生細胞数の百分率で臍帯血T細胞の補助機能を表現した。

3. 免疫グロブリン産生に対するT細胞の抑制作用

成人B細胞 2×10^5 個と成人T細胞 2×10^5 個の組み合わせに臍帯血T細胞 2×10^5 個を加えて前記通りの培養を行い、臍帯血T細胞を加えなかった時に出現する免疫グロブリン産生細胞数が、臍帯血T細胞の添加によってどの程度減少するかを抑制百分率で表現し、臍帯血T細胞の抑制作用とした。臍帯血T細胞の代わりに成人T細胞を同数添加したのでは免疫グロブリン産生細胞数の減少は起らないので、臍帯血T細胞による抑制はサプレッサーT細胞の増強を意味している。

一般のサプレッサーT細胞の機能発現がDNA合成阻害により阻止されることを利用し、臍帯血T細胞による抑制がそれ自体の抑制作用によるのか成人T細胞からサプレッサーT細胞の発現を誘導することによる間接的な作用によるのかを区別する試みを行った。すなわち成人T細胞ないし臍帯血T細胞を mitomycin C (MMC) $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ で 37°C 20分処理したものを用いた組み合わせも作って検討した。

また、臍帯血T細胞による抑制作用が液性因子によるものかどうかを調べるため、臍帯血T細胞を Pokeweed mitogen (PWM) 存在下で3日間培養しその上清を成人B細胞T細胞の培養に50%になるように添加してその抑制効果についても検討した。

4. 同種細胞に対する細胞障害性

成人リンパ球にEBウイルスを感染させトランスホームされた株化培養細胞AEBを標的として用いた。MMC $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ で 37°C 30分処理したAEB細胞 1×10^4 個を臍帯血リンパ球ないし成人リンパ球 5×10^5 個に加えて5日間培養、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ で標識したAEB細胞 2×10^4 個に上記感作リンパ球を加えて、 37°C 5時間反応させ、上清中の放射能をガンマカウンターで測定して遊離 ^{51}Cr 量を定量した。1N HCl で細胞を全融解した時の上清のカウント (total lysis) とリンパ球を加えなくとも5時間の間に遊離してきた ^{51}Cr のカウント (spontaneous release) から下記の式に従って% lysis を算出し、臍帯血リンパ球の細胞障害活性とし、成人リンパ球のものと比較した。

$$\% \text{ lysis} = \frac{\text{experimental lysis} - \text{spontaneous release}}{\text{total lysis} - \text{spontaneous release}}$$

5. mitogen で誘導されるT細胞の細胞障害作用

臍帯血T細胞ないし成人T細胞 5×10^5 個に PWM $10 \mu\text{g}$ を加え培養液 1 ml に浮遊して24時間培養、Burkitt リンパ腫由来株化培養細胞である Raji 細胞を標的とし ^{51}Cr 標識 Raji 細胞 2×10^4 個に加えて5時間培養、上記のごとく% lysis を算定した。

6. NK 細胞活性

白血病由来の株化培養細胞 Molt III を標的とし ^{51}Cr 標識 Molt III 細胞 2×10^4 個に臍帯血リ

ンパ球ないし成人リンパ球 5×10^5 個を加えて5時間培養，同様に% lysis を算定し，成人リンパ球によるものと比較して臍帯血リンパ球の NK 活性を評価した。

結 果

B細胞から免疫グロブリン産生細胞への分化機能は臍帯血B細胞においてきわめて劣っていて，検討した15例全例が成人B細胞の50%以下であり，13例(87%)が20%以下であった(図1)。

T細胞のB細胞からの免疫グロブリン産生に対する補助機能も概して不良で，検討した17例すべてが成人T細胞の50%以下，13例(76%)が20%以下であった。これには後に述べるサプレッサーT細胞の増強の関与が大きいものと考えられる(図2)。

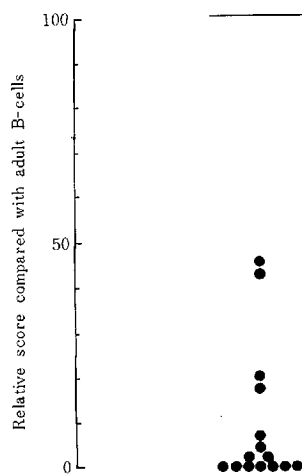


図1 Function of cord B-cells.

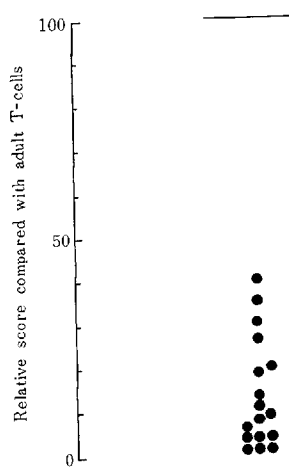


図2 Helper function of cord T-cells in Ig production.

臍帯血T細胞を成人B細胞T細胞の組み合わせに加えると21例中17例(81%)が後者からの免疫グロブリン産生を抑制した(図3)。この抑制作用は成人T細胞を MMC で処理しておいても認められるので，臍帯血T細胞自体にサプレッサー活性が存在すると考えられるが，臍帯血T細胞を MMC 処理しても成人T細胞に MMC 処理しないものを用いるとほとんどのもので抑制作用がみとめられるのに成人T細胞も MMC 処理したものを用いたのでは抑制作用が失われてしまうことから臍帯血T細胞には MMC 抵抗性で成人 T細胞からサプレッサー活性を誘導する働きも存在することが示唆された(図4)。

臍帯血T細胞の培養上清も成人B細胞T細胞からの免疫グロブリン産生を抑制する作用があり，T細胞の抑制作用は液性因子を介して営まれるものと考えられたが，その抑制活性は成人T細胞を MMC 処理したものに加えたのでは効果が少いところから，サプレッサー因子として直接ヘルパーT細胞ないしB細胞に作用するものと，MMCに感受性のあるサプレッサーの前段階の細胞からサプレッサーを誘導する因子との両方よることが予想された(図5)。

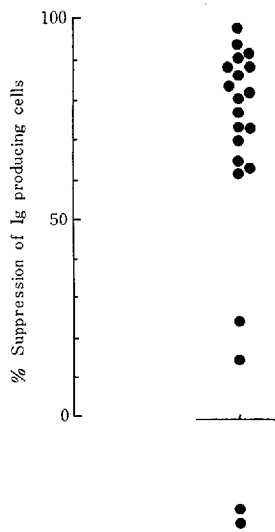


図3 Suppression by cord T-cells of Ig production from adult lymphocytes.

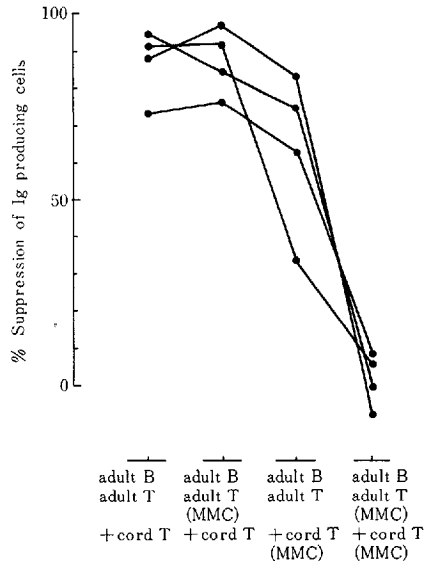


図4 Suppression by cord T-cells of Ig production from adult B- and T-cells. Requirement of both MMC sensitive and resistant T-cells.

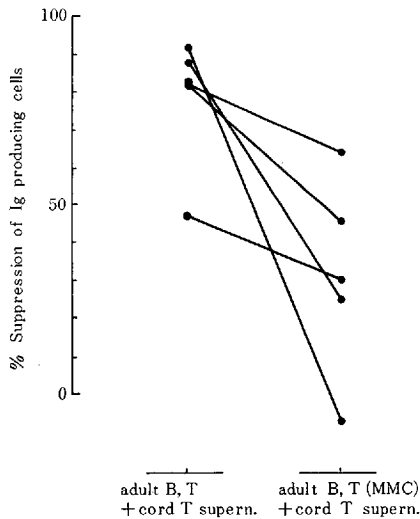


図5 Suppression by culture supernatant of cord T-cells of Ig production from adult B- and T-cells treated or untreated with MMC.

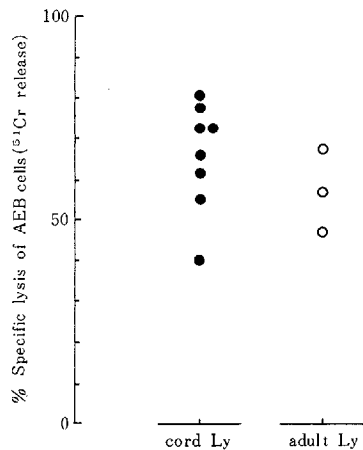


図6 Killer T-cell activity of cord lymphocytes against allogeneic cells. EBV transformed adult B-cells were used as target.

同種リンパ系細胞に対するキラーT細胞の活性は十分に誘導することが可能で、検討した臍帯血リンパ球8例全例で成人リンパ球と同等の細胞障害活性が認められた(図6)。

一方 mitogen で誘導されるT細胞のキラー活性は必ずしも十分でなく、成人T細胞程度の作用をみたのは10例中3例(30%)で残りはきわめて低下していた(図7)。

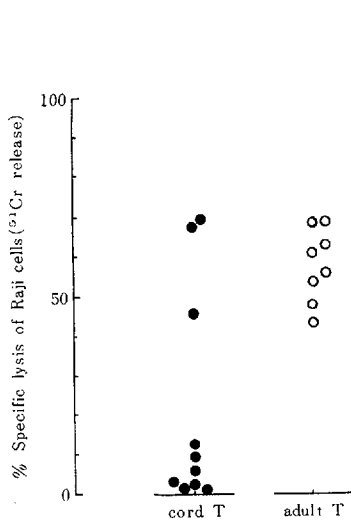


図7 Mitogen (PWM) induced killer activity of cord T-cells.

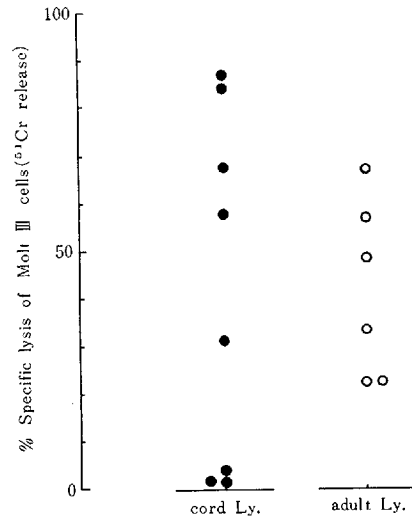


図8 NK activity of cord lymphocytes.

NK 細胞活性は Molt III を標的として調べると 8 例中 5 例 (63%) で十分な活性をみとめることができたが、残りの例では低下していた (図 8)。

考 察

免疫グロブリン産生系において新生児リンパ球は B 細胞の機能不全があり T 細胞についてはサプレッサーの増強があって抗体産生が不十分な状態にあると考えられた。このサプレッサー T 細胞の増強に関して興味をもたれたことは、MMC 処理した T 細胞を用いた B 細胞との組み合わせに対しては抑制を示さないにもかかわらず、未処理 T 細胞を用いた場合に対しては抑制を示す T 細胞ないしその因子が存在することが明らかにされた点である。すなわちサプレッサーの機能発現には MMC に抵抗性のサプレッサー誘導 T 細胞と MMC 感受性で上記 T 細胞によってサプレッサー活性を発揮するようになるサプレッサー T 細胞の 2 種類の T 細胞が存在することが示唆されたのである。

細胞障害機能は移植拒絶反応やウイルス感染防御に重要であるが、同種細胞に対するキラー T 細胞の機能が十分に発達していたという所見は、母親からの白血球などの侵入を防ぎ移植片対宿主反応が発生しないように生体を護る上で役立っているものと考えられる。

mitogen によって誘導される T 細胞のキラー活性の意義については明らかでないが同種細胞に対するキラー活性や NK 活性が正常であるようなリンパ球でも低下しているものが存在したことはキラー T 細胞や NK 細胞の働きとは異なったキラー活性であることが予想される。すなわちキラー T 細胞を polyclonal に活性化してその機能を調べているということにはならないと考えられる。また、NK 細胞を活性化しているわけでもないようである。

K 562 を標的細胞として用いた実験成績では臍帯血リンパ球の NK 活性は低いとされてい

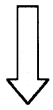
るのであるが、Molt III を用いた今回の成績では成人のものと同等の活性を示すものが大半であった。標的の種類によって NK 細胞の発達の度合いに差があることが考えられた。

ウイルスの増殖阻止に対して母親由来の抗体だけでは不十分であり、キラー T 細胞や NK 細胞の作用が重要と考えられるのであるが、新生児期にキラー T 細胞や NK 細胞の活性がある程度認められたことは意義のあることと思われる。

要 約

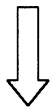
新生児のリンパ球機能の発達段階を明らかにし、原発性免疫不全症のスクリーニングの検査のための基礎資料をえる目的で研究を行った。

1. B 細胞からの免疫グロブリン産生機能は一般にきわめて低下していた。
2. 免疫グロブリン産生にかかわる T 細胞の B 細胞補助機能は低下しているものが多く、その原因としてサプレッサー T 細胞の増強が関与しているものと考えられた。
3. T 細胞の多くは成人リンパ球からの免疫グロブリン産生を抑制しサプレッサーの増強があると考えられたが、その作用はサプレッサー自身によるものとサプレッサーの誘導作用によるものがあると考えられた。またそれらの作用は T 細胞の産生する液性因子によると予想された。
4. 同種細胞に対するキラー T 細胞は十分に発達していてその活性が感作により発生しうる状況にあると考えられた。
5. NK 細胞活性は標的細胞の種類により未発達のものとかなり発達しているものがあると考えられた。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約

新生児のリンパ球機能の発達段階を明らかにし、原発性免疫不全症のスクリーニングの検査のための基礎資料をえる目的で研究を行った。

1. B 細胞からの免疫グロブリン産生機能は一般にきわめて低下していた。
2. 免疫グロブリン産生にかかわる T 細胞の B 細胞補助機能は低下しているものが多く・その原因としてサプレッサー T 細胞の増強が関与しているものと考えられた。
3. T 細胞の多くは成人リンパ球からの免疫グロブリン産生を抑制しサプレッサーの増強があると考えられたが、その作用はサプレッサー自身によるものとサプレッサーの誘導作用によるものがあると考えられた。またそれらの作用は T 細胞の産生する液性因子によると予想された。
4. 同種細胞に対するキラー T 細胞は十分に発達していてその活性が感作により発生しうる状況にあると考えられた。
5. NK 細胞活性は標的細胞の種類により未発達のものとかなり発達しているものがあると考えられた。