

川崎病末梢血のTh1/Th2バランスについて

(分担研究：小児慢性特定疾患等の疫学に関する研究(川崎病分科会))

研究協力者：古川 漸

共同研究者：松原知代、松岡 尚、片山久美子、

藤原元紀、古賀まゆみ

要旨：川崎病(KD)急性期の末梢血Tリンパ球のanergy状態についてTh1/Th2バランスの面から検討した。末梢血Tリンパ球をBrefeldin A 存在下に、Phorbol 12 Myristate 13 Acetate とIonomycin で刺激後、細胞内サイトカイン染色法を用いてTリンパ球をフローサイトメトリーで解析した。川崎病急性期のIFN- γ 産生CD3+Tリンパ球は減少しており、Th1タイプのTリンパ球の機能低下が示唆された。

見出し語：川崎病、Tリンパ球anergy状態、Th1/Th2バランス、細胞内サイトカイン

研究目的：川崎病(KD)急性期の末梢血Tリンパ球は、マクロファージ/モノサイトが活性化していることとは異なり、anergy状態(ある種の免疫不応答状態)であることを報告してきた。末梢血CD4+、CD8+ Tリンパ球数は減少し¹⁾、活性化抗原であるHLA-DRの発現はみられない²⁾。また活性化に伴い血清中に遊離する soluble CD2 の上昇がみられないこと³⁾や、細胞間接着分子であるLFA-1の蛍光強度の強い部分のTリンパ球の減少がみられること⁴⁾などがその理由である。

Tリンパ球はその産生するサイトカインによってTh1タイプ(IL-2, IFN- γ など産生)とTh2タイプ(IL-4, IL-10など産生)に分類され、疾患によってそのTh1/Th2バランスが報告されている⁵⁾。近年、細胞内サイトカインを染色しフローサイトメトリーで解析する方法が開発された⁶⁾⁻⁶⁾。

そこでこの細胞内サイトカイン染色法を用いてKDの末梢血Tリンパ球のanergy状態についてTh1/Th2バランスの面から検討した。

対象および方法：川崎病患者4例(男児3例、女児1例)について急性期治療前(平均5.5 \pm 1.3病日)と回復期(平均47.8 \pm 4.8病日)にサンプリングした。正常対照はほぼ同年齢の健常小児2例である。既に報告されている方法⁶⁾⁻⁶⁾に準じて測定した。ヘパリン採血した末梢血をBrefeldin A (BFA, 0.5mg/ml) 存在下に、Phorbol 12 Myristate 13 Acetate (PMA, 25ng/ml) とIonomycin(1mg/ml)で刺激し37 $^{\circ}$ C、10%CO₂ incubator内で4時間培養する。刺激後のリンパ球を"FASTIMMUNEサイトカインシステム"(日本ベクトンディッキンソン社)を用いて細胞内サイトカインを染色しフローサイトメトリーで解析した。

細胞膜表面抗体としてPerCP標識抗CD3抗体を、細胞内サイトカインとしてFITC標識抗IFN- γ 抗体およびPE標識抗IL-4抗体を用いた。

結果：KD急性期のCD3+Tリンパ球中のIFN- γ 産生CD3+Tリンパ球は $6.3 \pm 2.3\%$ (mean \pm SD)で、回復期 ($15.4 \pm 4.7\%$) および健常小児 ($17.5 \pm 1.6\%$) に比し減少していた (Fig1)。CD3+Tリンパ球中のIL-4産生CD3+Tリンパ球はKD急性期平均 $1.7 \pm 0.7\%$ 、回復期平均 $3.1 \pm 4.2\%$ 、健常小児 $0.8 \pm 0.8\%$ と急性期は健常小児と同程度であったが、回復期に上昇した症例があった。4

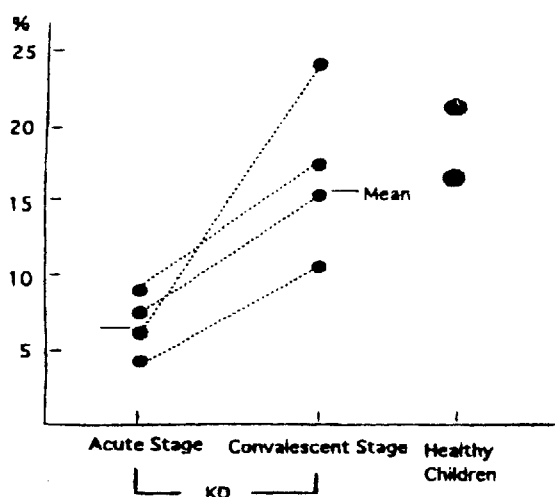


Fig. 1 The percentage of IFN- γ producing CD3+T lymphocytes gated on CD3+T lymphocytes in KD patients and control subjects.

才1カ月のKD女児例の急性期 (第5病日) と回復期 (第50病日) のフローサイトメトリーを Fig2に示す。

考察：川崎病末梢血の免疫病態はマクロファージ/モノサイトの活性化とTリンパ球のanergy状態 (ある種の免疫不応答状態) に特徴づけられる。マクロファージ/モノサイトの活性化については、末梢血中CD14+マクロファージ/モノサイト数の増加¹³⁾、活性化細胞膜表面抗原の発現¹⁰⁾、TNF- α などの炎症性サイトカイン⁹⁾、¹¹⁾、¹²⁾やMCP-1などのケモカインの上昇がみられること¹³⁾などを報告してきた。さらにCD14+マクロファージ/モノサイトの活性化はその超微構造の面からも明らかであった¹⁴⁾。

本研究では末梢血Tリンパ球のanergy状態についてTh1/Th2バランスの面から検討した。少数例の検討ではあるが、KD急性期にIFN- γ 産生CD3+Tリンパ球の減少がみられた。radioimmunoassayで測定した血清中IFN- γ が76%の症例で測定感度 (0.3U/ml) 以下であったこと¹¹⁾を考えあわせると、KD急性期の末梢血ではIFN- γ 産生Tリンパ球の機能低下、すなわちTh1タイプのTリンパ球の機能低下が示唆された。

Th2タイプについては、KD急性期のIL-4産生

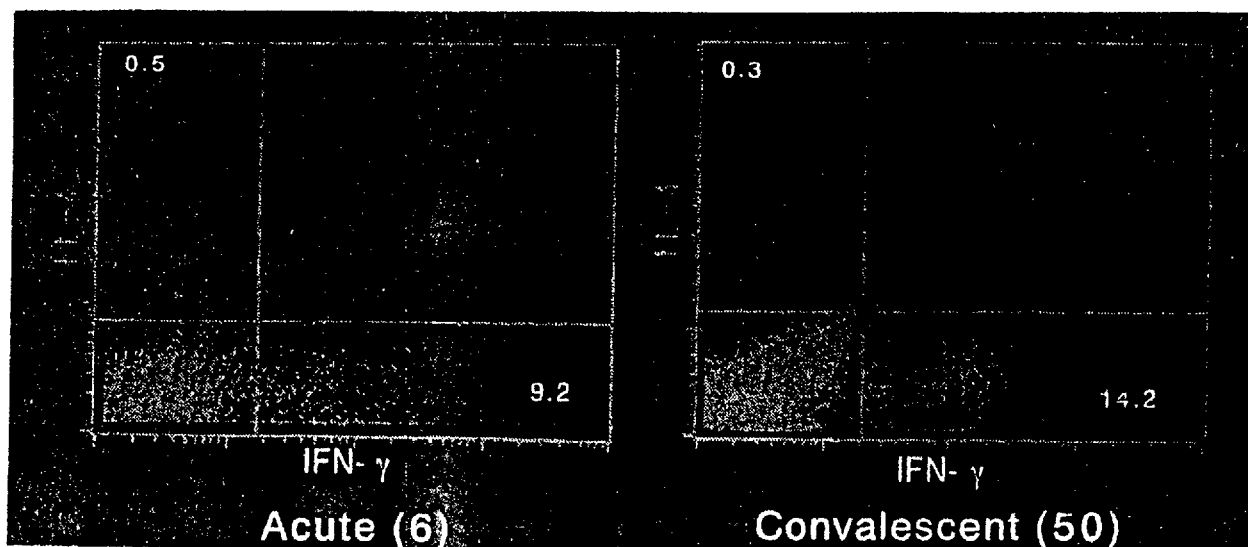


Fig. 2. Intracellular detection of IFN- γ and IL-4 gated on CD3+lymphocytes from peripheral blood of a KD patient.

CD3+Tリンパ球は健常小児と同程度であった。回復期にIL-4産生Tリンパ球の増加がみられた症例があった。このことはKD患児では一過性の血清IgE値の上昇¹⁵⁾やアレルギー素因を有する症例が多い^{16),17)}ことと関連しているように思える。

今後この末梢血Tリンパ球の機能低下と著しい活性化を示すマクロファージ/モノサイトとの関連を明らかにすることがKDの病因究明に重要であろう。

文献：1) Furukawa S et al : Mononuclear cell subsets and coronary artery lesions in Kawasaki disease. Arch Dis Child 67: 706-708, 1992.
2) Furukawa S, et al: Serum soluble CD4 and CD8 levels in Kawasaki disease. Clin Exp Immunol 86: 134-139, 1991.
3) Furukawa S et al: Soluble CD2 levels in serum during acute Kawasaki disease and infectious mononucleosis. J Infect Dis 167: 778-779, 1993.
4) Furukawa S et al: Transient depletion of T cells with bright CD11a/CD18 expression from peripheral circulation during acute Kawasaki disease. Scand J Immunol 37: 377-380, 1993.
5) Mosman TR et al: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today 17: 138-146, 1996.
6) Jung T et al: Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. J Immunol methods 159: 197-207, 1993.
7) Prussin C et al: Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. J Immunol methods 188: 117-128, 1995
8) Krug N et al: T-cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. Am J Respir Cell Mol Biol 14: 319-326, 1996.

9) Furukawa S et al: Peripheral blood monocyte/macrophages and serum tumor necrosis factor in Kawasaki disease. Clin Immunol Immunopathol 48: 247-251, 1988.

10) Furukawa S et al : Expression of FcεR2/CD23 on peripheral blood macrophages/monocytes in Kawasaki disease. Clin Immunol Immunopathol 56: 280-286, 1990.

11) Matsubara T et al: Serum levels of tumor necrosis factor, interleukin 2 receptor, and interferon-γ in Kawasaki disease involved coronary artery-lesions. Clin Immunol Immunopathol 56: 29-36, 1990.

12) Furukawa S et al : Increased levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 in Kawasaki disease. Arthritis Rheum 35: 672-677, 1992.

13) 松原知代ほか：川崎病の免疫応答。小児科臨床 50: 2141-2148, 1997.

14) Koga M et al: Activation of peripheral blood monocytes and macrophages in Kawasaki disease: ultrastructural and immunocytochemical investigation. Pathol Int, in press

15) Furukawa S et al : Increased expression of FcεR/CD23 on peripheral blood B lymphocytes and serum IgE levels in Kawasaki disease. Int Arch Allergy Appl Immunol 95 : 7-12, 1991.

16) Matsubara T et al: A sibship with recurrent Kawasaki disease and coronary artery lesion. Acta Pediatr 83: 1002-1004, 1994.

17) Matsubara T et al: The prevalence of allergy in Kawasaki disease. Allergy, in press



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



要旨:川崎病(KD)急性期の末梢血 T リンパ球の anergy 状態について Th1/Th2 バランスの面から検討した.末梢血 T リンパ球を Brefeldin A 存在下に、Phorbol 12 Myristate 13 Acetate と Ionomycin で刺激後、細胞内サイトカイン染色法を用いて T リンパ球をフローサイトメトリーで解析した.川崎病急性期の IFN- γ 産生 CD3+T リンパ球は減少しており、Th1 タイプの T リンパ球の機能低下が示唆された.