

5. 免疫不全症早期診断の基礎資料としての 新生児期リンパ球機能

研究協力者 矢 田 純 一
(東京医科歯科大学小児科)

共同研究者 田 中 順 子
(東京医科歯科大学小児科)

衣 川 直 子
(東京都立母子保健院)

目 的

先天性免疫不全症を検査により早期に発見することは有効な対策を立てる上で重要なことと考えられるが、免疫機能の異常を評価するための健康人における基礎資料が新生児期乳児期についてはまったく不十分な現状である。新生児期には成人とはかなり異なった免疫系の状態が存在することが知られてきており、成人での免疫機能を指標として乳児期の免疫異常を評価することは不適當である。新生児期・乳児期に免疫不全の存在を診断するための基準をえるため、新生児のリンパ球についてさまざまな機能を検討した。

方 法

1. リンパ球とその亜群の分離

臍帯血をヘパリン添加採取し、Conray-Ficoll 比重遠心法にて単核球を分離した。T細胞と non-T 細胞 (B細胞, 単球) とは、単核球にヒツジ赤血球を加えてT細胞とヒツジ赤血球とのロゼットを形成させた後、同じく比重遠心にかけて、管底に集まるロゼット形成細胞 (T細胞) と中間層に集まるロゼット非形成細胞 (non-T 細胞) とをそれぞれ回収した。T γ 細胞 (IgG のFc 部に対するレセプターをもつT細胞) と Tnon γ 細胞 (その他のT細胞) とはT細胞を Theophylline 4mM/ml 溶液中で 37°C, 2時間処理した後、再びヒツジ赤血球とのロゼットを形成させロゼット形成細胞とロゼット非形成細胞とを同様に比重遠心法にて分離した。ロゼット非形成細胞分画に T γ 細胞が含まれる。

2. 同種リンパ球に対するキラーT細胞活性

T細胞 4×10^5 個に $50 \mu\text{g/ml}$ の mitomycin C (MMC) で 37°C 20分処理した non-T 細胞 1×10^5 個を加え更にリンパ系株化培養細胞 (B細胞由来) 2×10^4 個を MMC で処理したものを同種抗原として加え、37°Cにて 5%CO₂ インキュベーターで4日間培養、³H-thymidine を $1 \mu\text{Ci/ml}$ に加え4時間培養を続けた後細胞を回収し、液体シンチレーション・カウンターにて細胞に取り込まれた放射能活性を測定し、T細胞のリンパ球混合培養反応性を調べた。

他の培養については5日間の培養後、抗原刺激として用いたのと同じの細胞を ^{51}Cr で標識したものの 2×10^4 個を加え、5時間培養を続けた後、遠心し上清中の放射能活性をガンマー・カウンターで測定した。HClを加え人工的に破壊した細胞の上清の活性をtotal lysisとし実験群の値(experimental lysis)それぞれから標的細胞のみからのもの(spontaneous lysis)を差し引いて、各実験群のtotal lysisに対する百分率をもって細胞障害性を評価した。

3. NK細胞活性

各種株化培養細胞(Molt III, K562, Raji, Daudi, EBウイルスでトランスフォームした健康人株化リンパ球) 2×10^4 個を ^{51}Cr で標識したものに全単核細胞ないしT細胞またはnon-T細胞 4×10^5 個を加え、 37°C 、5時間、5% CO_2 インキュベーターで培養した後、キラーT細胞の場合と同様にして% lysisを算定し細胞障害性を検討した。

4. B細胞の免疫グロブリン産生能

臍帯血ないし成人末梢血のnon-T細胞 2×10^5 個に成人末梢血T細胞 4×10^5 個を加えたものの組み合わせ各々にPokeweed mitogen (PWM)を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加、 37°C にて6日間5% CO_2 インキュベーターで培養後、細胞数を算定、細胞塗抹標本を作りアセトン固定後、抗ヒト免疫グロブリン蛍光抗体にて細胞を染色、蛍光顕微鏡下に観察して原形質蛍光陽性細胞を免疫グロブリン産生細胞として算定した。臍帯血non-T細胞からの免疫グロブリン産生細胞(Ig細胞)数と成人non-T細胞からのIg細胞数とを比較して相対的に臍帯血B細胞からのIg細胞出現機能を評価した。

5. 免疫グロブリン産生におけるヘルパーT細胞機能

成人non-T細胞 2×10^5 個に臍帯血T細胞ないし成人T細胞 4×10^5 個を加え、各々の組み合わせの細胞を前記の通りPWM刺激下に培養して、各々からの出現Ig産生細胞数を算定し、成人T細胞を用いた時の数に対する百分率をもって臍帯血T細胞の補助能として評価した。

6. 免疫グロブリン産生に対するサプレッサーT細胞機能

成人non-T細胞 2×10^5 個とT細胞 2×10^5 個の組み合わせに臍帯血T細胞ないし T_γ 細胞あるいは $\text{T}_{\text{non}\gamma}$ 細胞 2×10^5 個を加えてPWM存在下に培養して前記同様出現Ig産生細胞数を算定した。

臍帯血T細胞を添加しなかった場合の出現Ig細胞数に比し臍帯血T細胞添加によってIg細胞数がどれだけ減少するかを百分率で示しサプレッサーT細胞活性とした。

7. 免疫複合体存在下での T_γ 細胞の細胞障害作用

T_γ 細胞は免疫複合体の介在によって特定の株化培養細胞(たとえばRaji)の増殖を阻害する作用がある(immune complex dependent T cell mediated cytostasis, IDTC)。標的細胞 1×10^4 個に熱凝集IgGで処理した T_γ 細胞 $0.5 \times 10^4 \sim 4 \times 10^5$ 個を加えて 37°C 、2日間5% CO_2 インキュベーターで培養、標的細胞の数を算定し T_γ 細胞非添加時に比し、 T_γ 細胞添加によってどれだけ細胞増殖が抑制されたかを評価した。

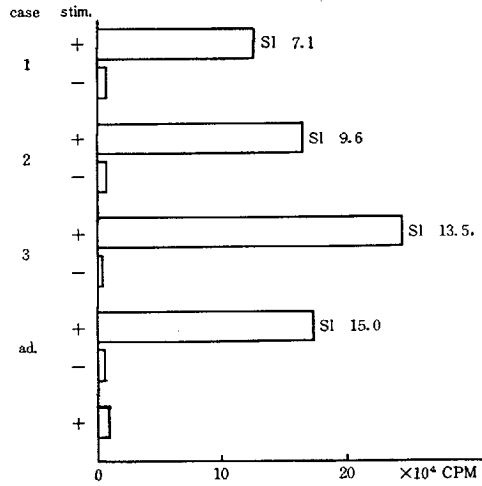


図1 臍帯血T細胞の同種リンパ球混合培養反応は成人のものに匹敵する。MMC (mitomycin C) 処理B細胞由来株化細胞を stimulator (stim) とし MMC 処理自己 non-T 細胞存在下にT細胞を添加して調べた。(ad. 成人T細胞)

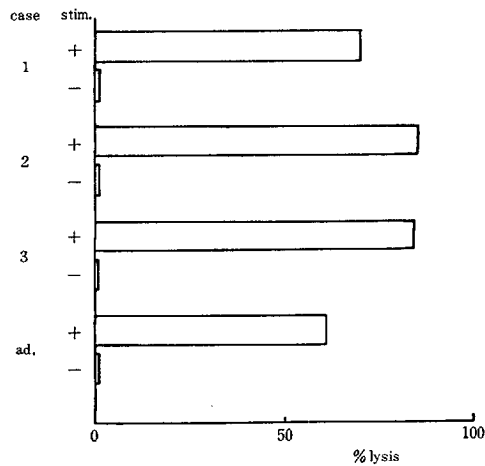


図2 臍帯血T細胞は成人のものと同等の同種リンパ系細胞に対するキラー活性を示す。図1と同じ培養細胞を stimulator に使用したものと同一の細胞に ⁵¹Cr を標識したものを標的として調べた。

結 果

1. 同種リンパ球抗原に対するT細胞の増殖反応は良好で対照とした成人T細胞に匹敵するDNA合成度を示した(図1)。HLA抗原適合性の問題を考え、他の同種B細胞由来株化細胞を Stimulator として2種類同様に検討したがほぼ同様の結果をえた。

2. 上記のごとくして誘導されたT細胞のキラー活性も同じく良好で、高い% lysisを示した。標的細胞の種類を他に2つほど変えた実験でも同様の結果であった(図2)。

表1 標的細胞の種類とNK作用に対する感受性の相異
臍帯血リンパ球と成人リンパ球の比較。

標的細胞	K 562	Molt III	Raji	Daudi	AEB
成人 T	4.5	36.3	2.0	6.8	3.4
臍帯血 T	4.8	59.0	1.4	5.2	2.6
成人 non-T	20.8	39.0	5.3	10.6	0.6
臍帯血 non-T	30.5	58.0	7.0	-9.0	-0.9

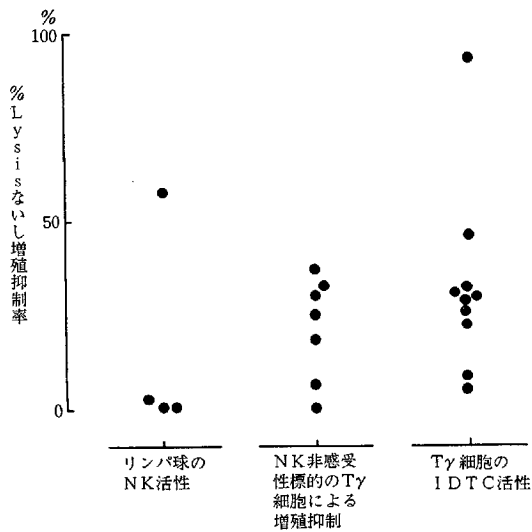


図3 臍帯血リンパ球の Spontaneous cytotoxicity と IDTC能。cytolytic な作用は弱いものが多いが cytostatic な作用は成人のものに匹敵する。
(NK は ^{51}Cr 標識 Molt III を, cytostasis と IDTC には Raji を標的細胞として使用)

3. NK 細胞活性は低いものが多かったが、約 $\frac{1}{4}$ の例で成人リンパ球と同等のキラー活性がみられた(図3)。活性のあった例でさまざまな標的細胞を用いて検討してみたところ、成人リンパ球に感受性のある標的細胞は臍帯血リンパ球にも感受性があり、成人リンパ球に抵抗性のものは同様に抵抗性を示した。すなわち NK 活性のスペクトルは成人のものと同じ(表1)。

4. T γ 細胞による IDTC 機能は多くの場合 effector/target 比1前後で最大となるが、11例中9例で機能がみられ、臍帯血 T γ 細胞でも十分発達していると考えられた。T γ 細胞には effector/target 比10以上にすると標的細胞に対し NK 活性を示すが、NK 作用に感受性のない標的細胞に対しても cytostatic な活性がある。臍帯血 T γ 細胞では約70%にこのような cytostatic な作用を認めた(図3)。

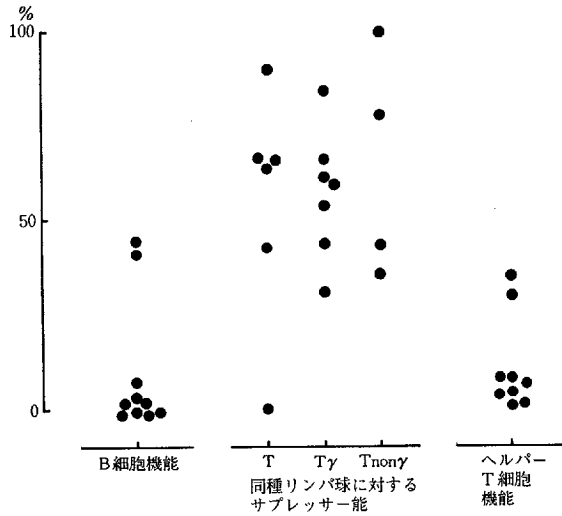


図4 臍帯血リンパ球の免疫グロブリン産生系の機能。B細胞は成人T細胞によっても十分免疫グロブリンを産生しない（成人B細胞を用いた時を100として相対評価）。T細胞は成人リンパ球からの免疫グロブリン産生を抑制する（非添加時を100として抑制率を算定）。ヘルパーT細胞機能がみられないものが多い（成人B細胞に対する効果を成人T細胞によるものを100として相対評価）。

5. 臍帯血B細胞は成人T細胞の補助によっても多くの場合十分な免疫グロブリン産生細胞への分化はみられなかった。しかし、約1/5の例で成人B細胞の50%程度の免疫グロブリン産生細胞の生成をみた（図4）。

6. 臍帯血T細胞を成人 non-T 細胞に加えた場合の成人 non-T 細胞（B細胞）からの免疫グロブリン産生細胞の出現は不良でヘルパー機能は一見みられないように考えられた（図4）。

しかし、臍帯血B細胞が免疫グロブリン産生細胞にかなり分化しうるような症例で調べてみると成人 non-T 細胞にはヘルパー作用をまったく示さないにもかかわらず、自己の non-T 細胞に対しては成人T細胞と同等のヘルパー効果を示した。このことは同種のB細胞を用いて調べたのではヘルパーT細胞の機能をみるのに不適當であり、ヘルパー機能は正常である可能性が大きいと考えられた（図5）。

7. 成人 non-T 細胞，成人T細胞の組み合わせからの免疫グロブリン産生細胞の出現に対し、臍帯血T細胞はほとんど常に抑制作用を示した（図4）。このことは一見サプレッサーT細胞の活性化を考えさせるが、自己のB細胞に対してヘルパー作用を示した臍帯血T細胞も、成人リンパ球に対して上記のような抑制作用を示したので、真にサプレッサー作用なのか問題が残された。

このサプレッサー様の作用はT細胞の中の T γ 細胞分画にも Tnon γ 細胞分画にも証明された。

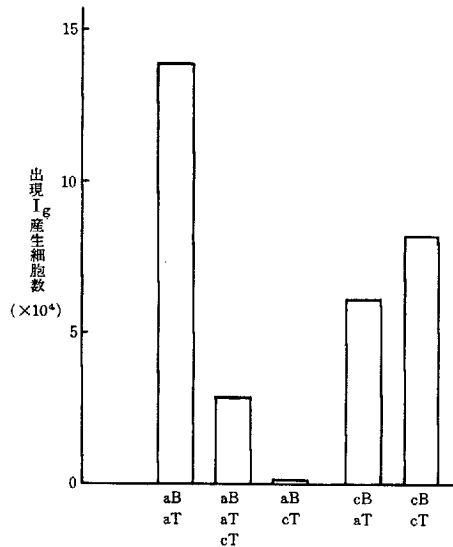


図5 自己のB細胞に対しては良好なヘルパー作用を示すT細胞が同種成人リンパ球に対してはサプレッサー様の効果を示す例がある。(a：成人，c：臍帯血，B：B細胞，T：T細胞)

考 察

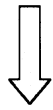
以上の成績より、臍帯血T細胞には同種細胞を排除するキラー活性は十分に存在することが考えられた。NK 標的細胞の活性については低下しているものが多いが、cytolysis に至らなくとも cytostrastis でみられるような細胞障害性は成人リンパ球とほとんど変わらないようであった。

一方、免疫グロブリン産生系においては成人のものとかかなり異なった所見がえられた。すなわち、B細胞の免疫グロブリン産生細胞への分化能はきわめて不良であることがみられた。免疫グロブリン産生を調節するT細胞系についても、成人B細胞を用いて調べる限り、ヘルパー作用がなく強いサプレッサー活性を示すという所見がえられたが、この点に関しては問題がある。すなわち、B細胞機能がかなり保たれているような例では、自己のB細胞に対しては十分なヘルパー能を示すにもかかわらず成人リンパ球からの免疫グロブリン産生を抑制したからである。この説明としては、臍帯血T細胞中にはサプレッサーの誘導細胞は存在するがサプレッサー自身は存在しないためであること、同種リンパ球に対するキラー活性が強いため抑制するように見えることなどが考えられる。この点を明らかにするべく検討予定である。

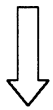
以上のように臍帯血リンパ球の機能には成人のものとは異なった点があつかみられる。幼児とくに新生児期・乳児前半において免疫機能を評価するにあたっては、健康児での相応年齢における機能を明確にしてそれとの比較において論ずる必要があることがあらためて明らかになったと考える。

要 約

新生児のリンパ球では、同種細胞に対するキラーT細胞活性は成人のものほとんど変わらないが、NK細胞の cytolytic な作用は弱いものが多いこと、B細胞から免疫グロブリン産生細胞への分化機能は不良なものが多いこと、T細胞の免疫グロブリン産生系に与える効果としては同種リンパ球に対して調べる限りサプレッサーとしての作用を示すことなどの特徴があることがわかった。幼少年令での免疫機能を評価するにあたっては対照年令での健康者のものこのような特徴と対比することの重要性があらためて示唆された。



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

新生児のリンパ球では、同種細胞に対するキラーT細胞活性は成人のものとはほとんど変わらないが、NK細胞の cytolytic な作用は弱いものが多いこと、B細胞から免疫グロブリン産生細胞への分化機能は不良なものが多いこと、T細胞の免疫グロブリン産生系に与える効果としては同種リンパ球に対して調べる限りサプレッサーとしての作用を示すことなどの特徴があることがわかった。幼少年令での免疫機能を評価するにあたっては対照年令での健康者のもののこのような特徴と対比することの重要性があらためて示唆された。