

急性期川崎病患児のTリンパ球 Vbレパートリーの解析

(分担研究：川崎病のサーベイランスに関する研究)

阿部 淳、香坂 隆夫

要約：急性期の川崎病の11症例について、末梢血中のTリンパ球抗原レセプター（TCR）のVbレパートリーを解析した。その結果、TCRにVb2を表現するTリンパ球が、対照群に比べて有意に増加していた。川崎病の発症に、ブドウ球菌や溶血性連鎖球菌の産生する外毒素に代表される、スーパー抗原が関与していることを示唆する所見と考えられる。

見出し語：川崎病、スーパー抗原、Tリンパ球抗原レセプター（TCR）

近年、川崎病の原因として、細菌毒素、とりわけブドウ球菌や溶血性連鎖球菌が産生する外毒素が注目されている。これらの外毒素は、しょう紅熱や毒素性ショック症候群など川崎病に類似した臨床症状を呈するほかに、マクロファージやTリンパ球、Bリンパ球などの免疫系細胞を広範囲に活性化するスーパー抗原として知られている。

研究協力者らは、これまでに、急性期の川崎病患児の末梢血中で特定のTリンパ球抗原レセプター（TCR）の可変領域遺伝子（Vb）を発現するTリンパ球が増加していること、また、この増加は、通常の抗原刺激で

見られるようなクローナルな反応ではなく、スーパー抗原の関与を疑わせることを報告してきた。（Proc.Natl.Acad.Sci.USA.1992, J.Exp.Med.1993）

今年度は、急性期の川崎病の国内症例について、TCRのVbレパートリーを解析し、前記の所見を確認することを目的とした。

【対象と方法】

対象は、表1にまとめた通りである。このうち、グロブリン療法前、グロブリン療法後、回復期の三期を通じて継続的に検体が得られた川崎病患児は5名である。検体は、川崎病病因病態研究会（代表 鴨下 重彦教授）に

国立小児病院小児医療研究センター、免疫研究室：

National Children's Medical Research Center, Dept.of Immunology

表1. Profiles of the Patients and Controls

	Pre-IVGG	Post-IVGG	Convalescent	Healthy Children	Diseased Children
No.	11	10	6	11	5
Median Age (range)	1y4m 6m-8y	1y4m 6m-8y	1y4m 6m-3y6m	6y0m 3y0m-12y0m	3y2m 8m-12y0m
Sex (M:F)	9:2	8:2	5:1	6:5	3:2
Days of Illness (range)	4.8 d 3d-8d	9.2 d 7d-12d	29 d 19d-49d		4.0 d 3d-5d

参加している諸施設、病院の先生方のご協力により当研究室に送られてきた。有熱性疾患のコントロール群には、2名のブドウ球菌性皮膚熱傷症候群、3名のウイルス性発疹症の患児が含まれている。

方法は、急性期（発熱10日以内）および回復期（発熱20日以降）の川崎病患児、および対照群の児童から得られた末梢血中の単核球を、抗CD3抗体と共に3日間、その後IL-2と共に1日間培養し、Tリンパ球のVbレパートリーを解析した。

解析には、ふた通りの方法を用いた。第一の方法は、Vb特異的単クローン抗体による免疫蛍光染色とフローサイトメトリーである。ビオチン化抗ヒトVb2、8、17の各抗体（Immunotech, Marseille, FR）を一次抗体とし、PE-ストレプトアビジンおよびFITC化抗CD3、CD4、CD8抗体（Becton Dickinson, San Jose, CA）を二次抗体として二重染色を行ない、フローサイトメーター（Epics Profile, Colter）で解析した。

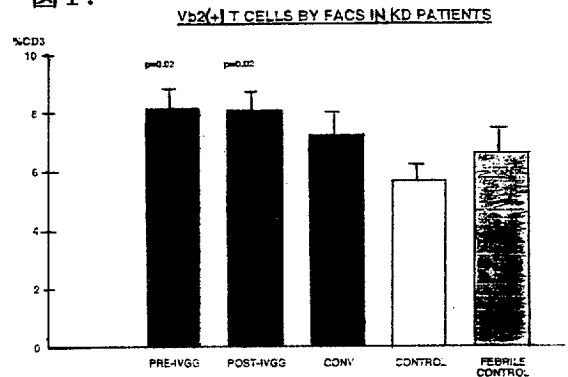
第二の方法は、Vb特異的プライマーを用いた定量的PCR法である。この方法では、Tリンパ球から抽出されたRNA 2ugを用いてcDNAを合成し、Vb特異的な5'プライマーと定常領域（Cb）の3'プライマーを用

いてPCRを行い、TCRのb鎖のcDNAを増幅した。定量化のために、TCRのa鎖の定常領域（Ca）のcDNAも同一反応液中で増幅して、PCR終了後、ゲル電気泳動を行い、VbとCaのバンドの強度比を計算した。（Vb/Ca比）

【結果】

抗ヒトVb2を用いたフローサイトメトリー解析の結果を、図1に示す。Dataは、CD3陽性細胞中のVb2陽性細胞の比率（%CD3）で表してある。

図1.



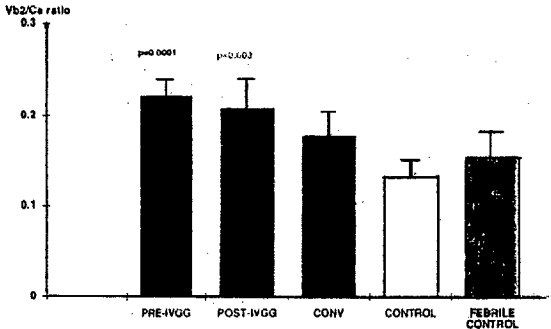
Vb2陽性Tリンパ球は、急性期の川崎病患児では、グロブリン療法前群で8.2±0.7%（mean ± SE%）、グロブリン療法後群で、8.1±0.6%であり、対照群の5.7±0.6%に比べて有意に上昇していた。（p=0.02）回復期の川崎病群、コントロールの有熱性疾患群では、それぞれ、7.3±0.8%、6.6±0.9%であり、対照群との間に有意の差を認めなかったVb8陽性Tリンパ球およびVb17陽性Tリンパ球の比率は、いずれの群でも、対照群との間に有意の差を認めなかった。

図2に、PCR法により得られた、Vb2

／Ca比の結果を示す。

図2.

Vb2/Ca RATIO BY PCR IN KD PATIENTS



急性期の川崎病患者児では、Vb2／Ca比は、グロブリン療法前群で 0.22 ± 0.01 (mean ratio \pm SE)、グロブリン療法後群で 0.21 ± 0.02 であり、対照群の 0.13 ± 0.01 に比べて有意に上昇していた。($p=0.0001$, $p=0.003$) グロブリン療法前群では、検査した9名中6名が対照群の平均値 + 2SDよりも高い値を示した。回復期の川崎病患者児では、Vb2／Ca比は 0.17 ± 0.03 と対照群に比べてやや高い傾向を示したが、有意差は見られなかった。Vb2以外のレパートリーでは、Vb／Ca比は、急性期の川崎病群と対照群との間に有意差は見られなかった。また、コントロールの有熱疾患群では、正常の対照群と比べて有意に増加しているVbレパートリーは見られなかった。

図3. INCREASED Vb2/Ca RATIO IN KD PATIENTS

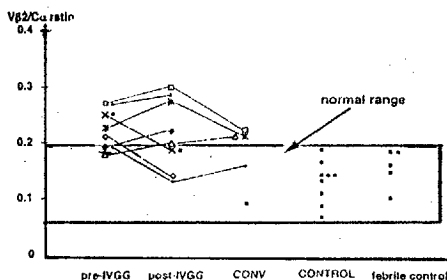


図3に、個々の川崎病患者児に見られたVb2／Ca比の継時的変化を示した。グロブリン療法後、Vb2／Ca比の低下が見られたものが8名中3名、不変または軽度の上昇が見られたものが5名と、一定の傾向は見られなかった。また、回復期においても、Vb2／Ca比の軽度上昇しているものが、5名中3名に見られた。

【考察】

今年度の研究の目的は、以前に米国の症例で報告された、急性期の川崎病患者児に見られるTリンパ球Vbレパートリーの変化、すなわち、Vb2陽性細胞とVb8陽性細胞の増加を、国内の症例でも確認することにあつた。その意味では、急性期におけるVb2陽性細胞の増加は、蛍光抗体法、PCR法の双方で確認された。

Vb8陽性細胞の増加が見られなかった点に関しては、種々の可能性が考えられる。第一は、双方の患者群で、Vbレパートリーの変化をきたす原因物質が異なる可能性である。スーパー抗原として働く細菌外毒素は、それぞれに特異的なVbレパートリーのTリンパ球を増殖刺激することが知られており、今回見られたパターンの相違は、双方で、原因となるスーパー抗原が異なることを示唆するものかもしれない。第二に、前回見られたVb8陽性細胞の増加は、非特異的現象だった可能性である。ヒトのVb8陽性Tリンパ球の増加は、これまでに、クローン病や慢性関節リウマチなどで報告されている。炎症の過程で、非特異的に反応するTリンパ球の中に、

レパートリーの偏りや人種差を示すものがあるのかもしれない。

川崎病の急性期にみられるVb2陽性Tリンパ球の増加および、そのポリクローナルな性格は、川崎病の発症に、スーパー抗原が関与することを示唆する所見である。しかし、この現象が川崎病の急性期の病態に、どう関与するのかは不明である。少なくとも、今回の継続的な観察の結果では、急性期に増加したVb2陽性Tリンパ球は、グロブリン療法

後も、急激に減少することなく、また、apoptosisによるclonal deletionを起こすこともなく、回復期に向かって緩徐に正常化していくようである。

今後の私達の研究の方向として、第一に、急性期の患児から、Vb2陽性リンパ球を実際に増殖刺激するようなスーパー抗原を分離すること、第二に、Vb2陽性リンパ球の川崎病急性期の病態における役割を明らかにすること、を目標とするつもりである。



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:急性期の川崎病の 11 症例について、末梢血中の T リンパ球抗原レセプター(TCR)の Vb レパートリーを解析した。その結果、TCR に Vb2 を表現する T リンパ球が、対照群に比べて有意に増加していた。川崎病の発症に、ブドウ球菌や溶血性連鎖球菌の産生する外毒素に代表される、スーパー抗原が関与していることを示唆する所見と考えられる。