

川崎病患児のリンパ球 T 細胞クローンの 解析：Vβ2, Vβ8の発現とサイトカインの産生性の検討

加藤裕久、坂口美奈子

要約：近年、急性期患児の末梢血リンパ球においてVβ2陽性T細胞が選択的に増加していると報告されスーパー抗原との関連が話題となった。今回、我々は当科受診の急性期患者20人の末梢血リンパ球中のVβ2およびVβ8.1陽性細胞を蛍光抗体法をもちいて測定が、有意な上昇は認められなかった。さらに、患者の病変部皮膚、頸部リンパ節および末梢血より得られたクローンT細胞についてはいずれもVβ2およびVβ8.1 TCRの発現は無く、TNF-αを産生するクローンT細胞が多く認められ、これらのT細胞が産生するTNF-αが川崎病の病態を引き起こしている可能性を示唆された。

見出し語：川崎病、クローンT細胞、Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α)

【目的】1992年、阿部らが急性期患児におけるVβ2陽性T細胞の増加を報告しスーパー抗原との関与が話題になり、さらにLEUNGらによりTSST1産生株が患児から分離されたと報告された。しかし前年度の本班会議で当施設より報告したように当科症例では血清中TSST1濃度は感度以下、さらにTSST-1抗体の有意な上昇は認められなかった。そこで今回、当科におけるVβ2陽性T細胞の関与を検討するために、当科受診患児の末梢血リンパ球のVβ2、Vβ8.1の発現の検討、さらに病変部皮膚、腫脹リンパ節及び末梢血から得られたクローンT細胞をもちいて、Vβ2、Vβ8.1の発現とサイトカイン産生性の検討を行った。

【対象と方法】1993年8月より1994年1月迄に当科を受診し川崎病診断基準を満たした患児であり、末梢血では、急性期は治療前、回復期は炎症所見消失後で発症15～96日に得られた検体である。コントロールとして非感染性の病気で受診したAGE MATCHEDコントロール健康成人コントロールをもちいた。(表1、2)

【結果】Fig1aにCD3陽性リンパ球中のVβ2、及びVβ8.1陽性細胞のパーセンテージを示す。急性期のVβ2陽性細胞の平均は8.0±2.0%、Vβ8.1陽性細胞の平均は

| 表1 | 対象 |
|---------------|---|
| 末梢血 | |
| 急性期 | 20人：平均2.20歳(0.42-10.50歳) |
| 回復期 | 20人：平均2.31歳(0.21-10.50歳) (内、ペア検体12人) |
| コントロール | |
| age matched | 18人：平均2.13歳(0.67-6.17歳) |
| healthy adult | 20人：平均31.62歳 (23.58-37.00歳) |
| 生検皮膚 | |
| 急性期 | 1人：年齢2.83歳、女児 |
| 生検リンパ節 | |
| 急性期 | 1人：年齢3.00歳、男児 |

| 表2 | 方法 |
|-------------------------------|--|
| Cell preparation | |
| 末梢血 | Fresh PBMC |
| | After activation: PBMCを抗CD3抗体で刺激して3日間培養後、洗浄1日間rIL-2にて刺激した |
| | Frozen samples: 数週間凍結保存したPBMCをfeeder cells存在下、抗CD3抗体で刺激して3日間培養後、洗浄2日間rIL-2にて刺激した |
| 生検検体 | PBSに渡し、ハサミで細かくスリガラスで細胞を圧出し回収した |
| Establishment of T cell clone | 限着系法にて実行 |
| Surface marker analysis | (Vβ2 or Vβ8.1 expression) |
| 末梢血 | 直接蛍光抗体法にて染色、FACScanにて測定 |
| クローンT細胞 | 直接蛍光抗体法にて染色、蛍光顕微鏡にて観測 |
| Cytokine analysis | |
| | TNF-α, IL-6: ELISA |
| | IL-2: Bioassay |

4.7±1.3%で回復期やコントロールとの有意差はなかった。同様にCD4およびCD8陽性リンパ球中においても有意差は認められなかった。(Fig1b, c)

阿部らの報告と当科の結果の違いにおいて対象地域の違い以外に、検体の処理仕方の違い、さらに採血時期の違いを考慮しつつの検討を行なった。(Fig2, 3) 特に、Fig2に示すようにCD3、CD4に関して検体は凍結や刺激を与えることでVβ2は平均6.7%から10.4%、7.2%から11.8%に上昇した。Fig3は急性期のkineticsで3人の平均を示すが、特に明らかな傾向はなかった。

次に2歳女児の病変部皮膚と末梢血より得られたクロー

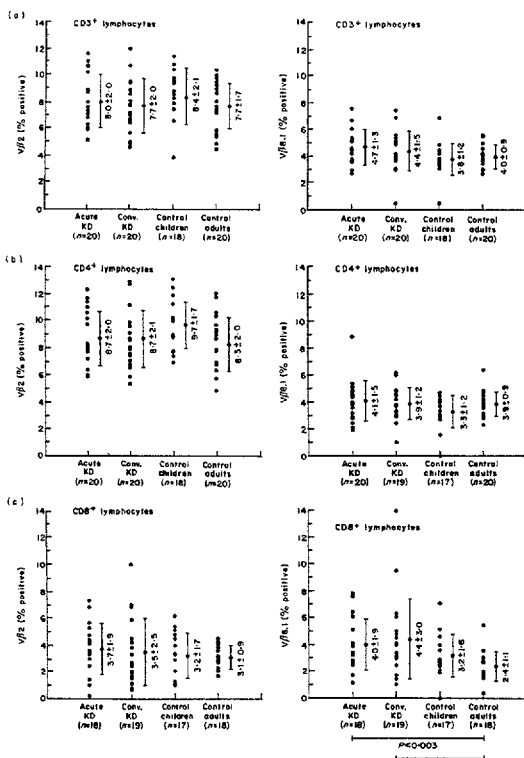


Fig. 1.

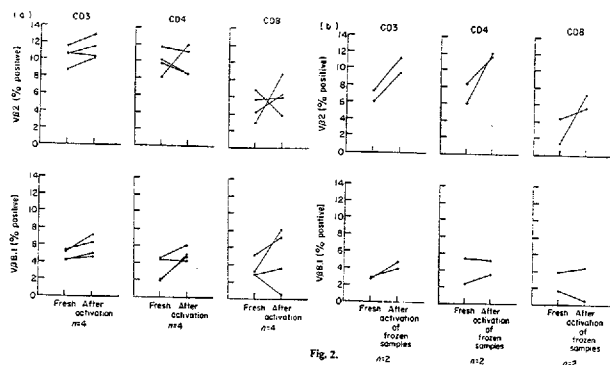


Fig. 2.

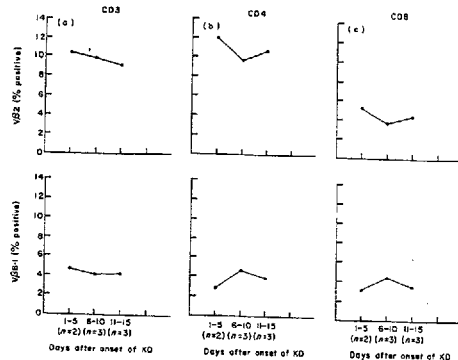


Fig. 3.

表3 Cytokine production by CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺ Vβ2⁺ Vβ8.1⁺ T cell clones from a patient with acute KD

| Stage | Site | Clone | TNF-α (pg/ml) | | IL-2 (pg/ml) | | IL-6 (pg/ml) | |
|-------------|------|-------|---------------|---------|--------------|---------|--------------|---------|
| | | | Medium only | PHA/PMA | Medium only | PHA/PMA | Medium only | PHA/PMA |
| Acute phase | Skin | S-1 | 7 | >1000 | <20 | 206 | <10 | <10 |
| | | S-3 | 21 | >1000 | <20 | >1000 | <10 | 149 |
| | | S-4 | 13 | >1000 | <20 | >1000 | <10 | 74 |
| | | S-5 | 7 | >1000 | <20 | >1000 | <10 | 189 |
| | | S-6 | 27 | >1000 | <20 | 289 | 14 | 347 |
| | | S-7 | 8 | >1000 | <20 | >1000 | <10 | 202 |
| | | S-8 | 9 | >1000 | <20 | >1000 | <10 | 167 |
| | | S-9 | 8 | >1000 | <20 | >1000 | <10 | 446 |
| | | S-10 | <5 | >1000 | <20 | >1000 | <10 | 20 |
| | | S-33 | 40 | >1000 | <20 | <20 | 14 | 321 |
| | | S-34 | 15 | >1000 | <20 | 35 | <10 | 97 |
| | | S-36 | 56 | >1000 | <20 | 413 | <10 | 190 |
| Conv. phase | PBL | P-5 | 10 | >1000 | <20 | 400 | <10 | 57 |
| | | P-6 | 13 | >1000 | <20 | 149 | <10 | 480 |
| | | P-7 | 12 | >1000 | <20 | >1000 | <10 | 174 |
| | | P-8 | 12 | >1000 | <20 | >1000 | <10 | 479 |
| | | P-10 | <5 | >1000 | <20 | 970 | <10 | <10 |
| | | P-11 | 15 | >1000 | <20 | 14 | <10 | 20 |
| | | P-12 | 12 | >1000 | <20 | 14 | <10 | 20 |
| | | P-13 | 12 | >1000 | <20 | 14 | <10 | 20 |
| | | P-19 | 47 | >1000 | <20 | 836 | <10 | 479 |

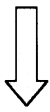
表4 Cytokine production by CD3⁺ Vβ2⁺ Vβ8.1⁺ T cell clones from patients with KD

| Stage | Site | Number of clones | TNF % positive (Range pg/ml) | IL-2 % positive (Range pg/ml) | IL-6 % positive (Range pg/ml) |
|-------------|------|------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Acute phase | Skin | 12 | 91.7% (7-56) | 0.0 | 1.7% (14-14) |
| | LN | 8 | 75.0% (8-282) | 50.0% (23-1000) | 0.0 |
| | PBL | 37 | 45.9% (6-1016) | 10.8% (66-113) | 5.4% (21-25) |
| Conv. phase | PBL | 48 | 70.8% (6-150) | 0.6% (43-156) | 6.3% (12-20) |

ーンのVβ2およびVβ8.1の発現は認めなかった。サイトカイン産生については非刺激下でIL-2,IL-6はほとんど産生しなかったが、TNF-αはほとんどのクローンが産生していた。(表3)さらに急性期の病変部皮膚、腫脹リンパ節、末梢血、回復期末梢血より得られたクローンT細胞計105個についてVβ2およびVβ8.1の発現の有無とサイトカイン産生について検討し感度以上の数値を示したクローン数のパーセンテージを表にした。(表4)やはりこれらのクローンもいずれもVβ2およびVβ8.1の発現は認められなかった。しかしサイトカインについては病変部皮膚より得られたクローンはほとんどがTNF-αを産生しており、リンパ節より得られたクローンはTNF-αのほかIL-2を半数のクローンが産生していた。さらに末梢血から得られたクローンについてはTNF-αを有意に産生し特に急性期のクローンのうち2つのクローンは844 pg/ml、1016 pg/mlと高値を示した。

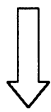
【結語】

- 1、当科における急性期川崎病患児末梢血中のVβ2およびVβ8.1陽性リンパ球の増加は確認できなかった。
- 2、当科における川崎病患児より樹立できたT細胞クローンでもVβ2およびVβ8.1の発現は認めなかった。
- 3、これらのT細胞クローンの多くが非刺激下にてTNF-αを産生していた。
- 4、以上より、Vβ2およびVβ8.1以外のT細胞レセプターを有するT細胞が川崎病の免疫病態に関与するものと考えられた。



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:近年、急性期患児の末梢血リンパ球においてV₂陽性T細胞が選択的に増加していると報告されスーパー抗原との関連が話題となった。今回、我々は当科受診の急性期患者20人の末梢血リンパ球中のV₂およびV_{8.1}陽性細胞を蛍光抗体法をもちいて測定が、有意な上昇は認められなかった。さらに、患者の病変部皮膚、頸部リンパ節および末梢血より得られたクローンT細胞についてはいずれもV₂およびV_{8.1}TCRの発現は無く、TNF- α を産生するクローンT細胞が多く認められ、これらのT細胞が産生するTNF- α が川崎病の病態を引き起こしている可能性を示唆された。