原 著

血液濃縮製剤治療中の血友病患者 における細胞性免疫機能に関する検討

安部 英* 風間 睦美* 木下 忠俊*
松田 重三* 川杉 和夫* 吉村 祐一*
合地 研吾* 柳 富子* 斎藤 紀子*

Studies on cellular immune functions of hemophiliacs under treatment with concentrate of antihemophilic factor

Takeshi ABE*, Mutsuyoshi KAZAMA*, Tadatosh KINOSHITA*,
Juzo MATSUDA*, Kazuo KAWASUGI*, Yūichi YOSHIMURA*,
Kengo GOHCHI*, Tomiko RYU* and Noriko SAITOH*

Key words: hemophilia, concentrate of antihemophilic factor (AHF),
AIDS (acquired immune deficiency syndrome), T4(helper/
inducer)/T8 (suppressor/cytotoxic) ratio, cellular immune
function

There have been reported many cases of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) among the groups of homosexuals, drug addicts, Haitian immigrants, prisoners and hemophiliacs under treatment with concentrate of antihemophilic factors in the United States and many European countries, but no case of definite AIDS has been reported in Japan so far yet.

Authors have observed two possible cases of AIDS in hemophiliacs, one of whom had high fever, generalized lymphadenopathy and splenomegaly, and died of sepsis with *Campylobacter jejuni*. The other surviving one was revealed abnormality of T cell subsets of peripheral lymphocytes. These observations prompted us to investigate the cellular immunity of hemophiliacs to find whether any case of apparent or latent AIDS was included in them.

Twenty one hemophiliacs (17 cases of hemophilia A and 4 cases of hemophilia B) were investigated their cellular immune functions of peripheral lymphocytes to prove that responsiveness of lymphocytes to mitogens (PHA and PWM) was

* 帝京大学医学部第一内科〔〒173 東京都板橋区加賀 2-11-1〕, The First Department of Medicine, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan.

impaired at various degrees, and the number of T_4 (helper/inducer) and T_8 (suppressor/cytotoxic) positive lymphocytes was decreased moderately or markedly, giving significant depression of T_4/T_8 ratio in all cases of hemophilia A and 3 in 4 cases of hemophilia B. These data showed good concordance with the decrease of natural killer (NK) activity and T cell colony forming activity.

はじめに

最近各方面で注目されてきた、いわゆる後天性免疫不全症候群 (acquired immune deficiency syndrome : AIDS) の臨床症状および検査所見のうち、米国連邦疾病予防センター (Center of Disease Control : CDC) が重要なものとして挙げているものの1つに細胞性免疫、ことにT細胞免疫機能の低下とそれに繋る日和見感染症およびカリニ肺囊虫肺炎 (Pneumocystis carinii pneumonia : PCP) がある。したがって本症候群の診断にはリンパ球の生態、なかでも細胞性免疫機能の不全所見が重要な条件とされている¹⁻⁷⁾。

しかしてこれ迄に発表された AIDS 患者のなかに、このような病態にある対象から採った血液を原料として作った血液製剤を治療のために輸注された血友病患者からの発症が報告されていて⁸⁻¹²⁾、血液製剤による補充療法が唯一の合理的療法である血友病患者にとり、この AIDS の診断と対策は極めて深刻な意義を持つこととなった。

著者らは最近 AIDS に似た臨床症状を示した2例の血友病患者を経験し、報告したが¹³⁾、そのほかにすでに長く、また多量にこのような血液製剤の輸注を繰り返し、現在正常な日常生活を送っている血友病患者について、リンパ球を中心とした細胞性免疫機能、すなわちリンパ球の減少、phytohemagglutinin (PHA)、あるいは pokeweed mitogen (PWM) 等に対するリンパ球の芽球化反応の低下、monoclonal 抗体による T cell subsets の分類変化、natural killer (NK) 細胞の減少などについて検討したので報告する。

I. 対象ならびに方法

1. 対象

検索の対象は、帝京大学第一内科外来に定期的診察、あるいは出血時の補充療法のために通院中の血友病患者の一部21例(血友病A 17例、血友病B 4例)である。なお、このうち1例は臨床所見から一応 AIDS の疑いがあるものと診断された血友病B患者である(症例18)。

被検患者の年齢は12歳から56歳に分布し、凝固因子欠乏の程度は軽症から重症まで多様で、本研究実施時までにおける第VIII因子、または第IX因子濃縮製剤の補充量、補充頻度もまた千差万別であった。

免疫学的検査を行う1週間前より、リンパ球機能に影響をおよぼす薬剤を服用していないことを確認し、また本研究の主旨を充分説明したうえで、患者より採血し以下の実験に供した。

2. 検査方法

a. リンパ球幼若化反応

患者より採取したヘパリン処理血をリン酸緩衝液 (PBS) にて2~3倍に希釈したのち、Ficoll-Hypaque 液に重層し、1,900 rpm 20分間遠沈して境界に得られるリンパ球層をさらに PBS で2回遠沈洗浄し、これを $5 \times 10^5/\text{ml}$ になるよう5% fetal calf serum (仔牛血清) 加 RPMI-1640 (日水製薬) 培養液に浮遊した。

この $200 \mu\text{l}$ を、最適、最高ならびに最小のリンパ球幼若化を惹起するように調整した3濃度の phytohemagglutinin (HPA) および pokeweed mitogen (PWM) とともに、マイクロプレート (住友ベークライト) に播種し、PHA 添加群は72時間、PWM 添加群は96時間 CO_2 培養器中で培養した。収穫4時間前に ^3H -thy-

midine (5 μ Ci) でパルスし、グラスフィルター上に培養細胞を採取し、液体シンチレーションカウンターで計測して、その幼若化率を stimulation index (SI) で表現した (正常 SI は PHA 130 ± 20 , PWM 110 ± 15).

b. T cell colony 形成試験

T cell コロニー形成試験は、仁保¹⁴⁾らの方法を一部改変して実施した.

すなわち、リンパ球幼若化反応の項で述べたと同様の方法で患者リンパ球を分離したのち、これを MEM 培養液 (日水製薬) に $1 \times 10^6 / \text{ml}$ になるよう浮遊させた. この浮遊液 0.1 ml を、沸騰蒸留中で溶解し、2 倍濃縮 MEM 培養液で調整した 2.2% メチルセルロース (Dow chemical) 0.4 ml, 10% 仔牛血清加 1 倍 MEM 培養液 0.4 ml および PHA 0.1 ml (100 μ g) とマイクロペトリディッシュ (35 $\times$ 10 mm, Falcon) 中に植え込んだのち、37°C, 5% CO₂ 存在下で 4 ~ 5 日間培養した. その後、光学顕微鏡下で観察し、50 個以上の細胞で形成されている細胞集団を 1 つのコロニーと判定して、ディッシュ中の全視野のコロニー数を数え、その値を T cell コロニー形成能とした. なお、本試験は duplicate で行なった. (正常値はコロニー形成 100 個以上/ディッシュ)

c. T cell サブセットの解析

T cell サブセットの分類は、リンパ球蛍光自動分析器 (スペクトラムⅢ, Ortho 社) を使用して実施した.

患者より採血したヘパリン処理血 100 μ l を PBS で 2 倍に希釈したのち、添付説明書の指定通り、PBS で希釈した T cell サブセットに対する各種蛍光標識モノクローナル抗体 (OKT 3, 4 および 8, Ortho 社) 10 μ l と混和し、4°C にて 30 分間反応させた. その後リンパ球浮遊液に添付の溶血試薬 2 ml を加え、よく転倒混和して 10 分間放置したのち遠沈し、上清を除去後リンパ球沈査を 1 ml の PBS に再浮遊してスペクトラムⅢを用いリンパ球サブセットを分析した. (正常値 T4/T8 比 1.2 以上)

d. Natural killer (NK) 活性の測定

先に述べた Ficoll-Hypaque 比重遠沈法により、患者リンパ球を分離し、10% 仔牛血清加

RPMI-1640 培養液にて、 $5 \times 10^6 / \text{ml}$ に調製し effector cell とした.

また target cell は、継代培養した K-562 細胞を ⁵¹Cr で 37°C 1 時間ラベルし、遠沈洗浄したのち、上記培養液にて $1 \times 10^5 / \text{ml}$ に調製して作製した. なお、特記した場合以外は effector および target cell 作製中の全ての操作を 4°C にて実施した.

この effector cell (100 μ l) と target cell (100 μ l) とをその比が 50 : 1 になるように V 底プレート (Falcon) に注入し、37°C 4 時間 CO₂ の存在下で反応させて遠沈したのち、上清を採取して、 γ カウンターで計測した. この値 (cpm) を自然解離 (SP) [target cell (100 μ l) と培養液 (100 μ l) とを反応させたコントロールの示す値] および最大解離 cpm(Max) [target cell (100 μ l) に 1N HCl (100 μ l) を加えた群の上清値] とから、次式により検体の NK cell 活性 (%) を求めた.

$$\text{NK cell 活性 (\%)} = \frac{\text{検体の cpm} - \text{SPcpm}}{\text{Max cpm} - \text{SPcpm}} \times 100$$

(正常値下限 30%)

II. 結 果

1. リンパ球幼若化反応

表 1 にまとめて示したごとく、リンパ球幼若化反応を実施できた血友病 A 患者 6 例中 2 例 (症例 2, 7) で、PHA のいずれの濃度に対しても反応性が著明に低下していた.

また、PWM に対する反応は 6 例全例で軽度ないし高度の反応性低下を示した. なお、PHA および PWM いずれに対しても幼若化反応が著明に低下を示した症例は 2 例 (症例 2, 7) であった.

血友病 B (症例 18 ~ 21) においては、1 例にのみ本反応を実施できたが (症例 20), PHA, PWM いずれの mitogen に対しても、その反応は著明に低下していた.

2. NK cell 活性

NK cell 活性は、正常下限を 30% とした場合、血友病 A 18 症例中 7 例に、また血友病 B 4 症例中 1 例に低下をみた. このうち、臨床的に AIDS と思われる症例 18 の NK cell 活性

Table 1 Lymphocyte-subset analysis and functional assays in hemophiliacs (No. 1~17, hemophilia A, 8~21, hemophilia B)

Case	WBC (/μℓ)	Lymphocyte Count (%)	Mitogen Stimulation Index (S.I.) of Lymphocytes						T cell colony formation (/μℓ)	T Cell Subsets (%)				NK cell activity (%)
			PHA			PWM				OKT 3	OKT 4	OKT 8	OKT 4/OKT 8 Ratio	
			0.5μg	10μg	50μg	0.5μg	10μg	25μg						
1. E.M.	7000	56								66	13	49	0.2	29.1
2. K.K.	6500	46	1.0	21.4	46.0	1.6	2.2	3	4	64	22	38	0.5	35.7
3. K.H.	6700	56	11.5	241.4	150.8	90.8	63.1	44.5	56	56	14	38	0.4	
4. H.H.	5200	45	1.86	151.4	114.5	1.8	52.7	51.0	74	54	22	30	0.7	
5. Y.H.	4900	32	3.1	190.0	176.0	8.7	36.5	26.0	64	75	25	51	0.4	17.2
6. M.O.	2800	22	8.1	217.0	116.0	6.9	11.4	11.2	5	20	8	10	0.8	68.8
7. K.O.	5900	42	0.7	2.6	6.9	7.4	10.1	6.5	32	69	25	48	0.5	18.2
8. S.M.	8800	44							2	58	31	28	1.1	65.8
9. T.T.	5100	59							1	70	34	32	1.06	58.4
10. K.G.	7500	37							0	69	40	34	1.1	63.9
11. H.K.										60.1	35.8	28.8	1.2	64.4
12. M.K.	4700	39								70	31	39	0.7	62.7
13. N.A.										76	29	46	0.6	51.3
14. K.G.	5900	52								71	31	38	0.8	39.9
15. Y.T.	5900	25								76	30	44	0.6	27.4
16. Y.H.	4200	44							195	47	15	24	0.6	20.5
17. T.M.	7000	30								80	19	58	0.3	22.9
18. H.M.	5700	17							10	62	36	38	0.9	1.8
19. M.I.	7900	26							1	70	29	41	0.7	30.4
20. H.K.	4800	29		1.8	1.1		1.3	2.1	128	74	30	48	0.6	59.2
21. K.S.										67	38	24	1.5	37.0

は 1.8% と著明に低下していた。

3. T cell colony 形成能

T cell colony 形成試験を実施できたのは、血友病 A 10 例および血友病 B 3 例であるが、血友病 A で T cell colony 形成能の著明な低下 (colony 数 10 個以下) を示したのは 5 例、中等度以下 (50 個以下) 1 例、軽度低下 (100 個以下) 3 例であり、わずか 1 例 (症例 17) のみがほぼ正常な T cell colony 形成能を示した。

一方、3 例の血友病 B のうち 2 例が著明な形成能低下を示したが、他の 1 例はほぼ正常であった。

4. T cell subsets 解析

OKT 3 抗体により同定されるリンパ球を T cell とみなした場合、絶対数の低下 (1,000/ μ l 以下) を示した血友病 A 症例は、17 例中 1 例のみであった。

OKT 4 抗体と反応するリンパ球については、

17 例の血友病 A 症例中 4 例が著明な低下 (20% 以下)、6 例が軽～中等度低下 (30% 以下) を示し、全体の 60% 近くが OKT 4 反応性リンパ球 (helper/inducer) 数の減少を示した。なお以上の OKT 4 反応性リンパ球数の減少は相対的のみならず、ほとんど全ての症例で絶対数の減少もみられた。

これに対し、血友病 B 4 例中 1 例が著明な、また 2 例が軽～中等度の減少を示した。

また、OKT 8 抗体と反応するリンパ球数 (suppressor/cytotoxic) は、血友病 A の 1 例 (症例 6) において著明な減少を示したが、血友病 B 症例を含めた他の症例では全て正常範囲内に分布した。

さらに、T cell subsets の OKT 4/OKT 8 比を求めると、血友病 A 全例が正常値下限の 1.2 以下を示した。

なお、血友病 B 4 例中 3 例においても、OKT

4/OKT 8 比の低下 (1.2 以下) を認めた。

IV. 考察ならびに結論

AIDS の診断で、細胞性免疫の低下が重要な基準となることが米国 CDC およびわが国厚生省 AIDS 研究班で認められたが、すでに AIDS の発症が報告されている血友病で⁸⁻¹²⁾、わが国の患者ではこの免疫学的変化がどのように認められるか、果してこの変化が AIDS の感染(かりに本症候群が病原体による感染症であると仮定して)にどのように呼応するか、またこの変化があれば他の臨床症状や検査所見がなくても、AIDS の潜伏期にあるものと解せられるか、あるいは血液製剤の輸注だけで、病原体の感染とは全く無関係に免疫機能が低下するものか、などに関して疑問が残されている¹⁵⁾。

そこで著者らは現在血液濃縮製剤療法をうけている血友病 21 例につき、細胞性免疫機能の検索を行なったところ、免疫異常を示しながら臨床症状に欠けるものの極めて多いことを見出した。すなわち血友病 A 患者および B 患者のリンパ球について、monoclonal 抗体を使用した T 細胞 subset による分析を行なうと、OKT⁴⁺ 対 OKT⁸⁺ の比の低下、ことに OKT⁴⁺ 細胞数の減少が有意に認められるほか、T 細胞コロニー形成不全もおこり、K-562 細胞を標的とした NK 細胞の活性低下も認められ、これらは比較的良好に呼応したが、しかしこれらの所見から直ちに各種臨床症状や検査所見を示さない症例を全て潜在性 AIDS とする積極的な情報は得られなかった。

また一方血液製剤の輸注により、受注者が本来持っている免疫機構の変化、例えば低下ないし偏奇のおこる可能性があり⁸⁾¹⁵⁾、血友病患者の場合も長年にわたる血液製剤の輸注により、免疫機能の低下することも、この立場から理解される。

したがって、これらの免疫機能の変化と、AIDS の感染ないし発症との因果関係を検討するには、さらに各種免疫機能の分割的検索、経時的追跡とともに、発熱やリンパ節腫脹、脾腫、肝腫、肺や皮膚の病的所見、出血性素因などを同時に注意深く観察することが大切で、これら

を含めた報告を次回に行いたいと思う。

文 献

- 1) Siegal F.P., Lopez, C., Hammer, G.S. et al.: Severe immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N. Engl. J. Med.*, **305**; 1431~1438, 1981.
- 2) Fornfels H., Vande Stouwe R.A., Lange, M., Reddy, M.M. et al.: T-lymphocytes subpopulations in homosexual men. *N. Engl. J. Med.*, **307**; 729~731, 1982.
- 3) Follansbee, S.E., Busch, D.F., Wofsy, C.B. et al.: An outbreak of *Pneumocystis carinii* pneumonia in homosexual men. *Ann. Intern. Med.*, **96**; 705~713, 1982.
- 4) Stahl, R.E., Friedman-Kien, A., Bubin, R. et al.: Immunologic abnormalities in homosexual men; relationship to Kaposi's sarcoma. *Am. J. Med.*, **73**; 171~178, 1982.
- 5) Mildvan, D., Mathur, U., Enlow, R.W., et al.: Opportunistic infections and immune deficiency in homosexual men. *Ann. Intern. Med.*, **96**; 705~713, 1982.
- 6) Friedman-Kien, A.E., Laubenstein, L.J., Rubinstein P. et al.: Disseminated Kaposi's sarcoma in homosexual men. *Ann. Intern. Med.*, **96**; 693~700, 1982.
- 7) Wormser, G.P., Krupp, L.B., Hanrahan, J.P. et al.: Acquired immunodeficiency syndrome in male prisoners, New insights into an emerging syndrome. *Ann. Intern. Med.*, **98**; 297~303, 1983.
- 8) Lererman, M.M., Ratnoff, O.D., Scillian, J.J. et al.: Impaired cell-mediated immunity in patients with classic hemophilia. *N. Engl. J. Med.*, **308**; 79~83, 1983.
- 9) Nenitove, J.E., Aster, R.H., Casper, J.T. et al.: T-lymphocyte subpopulations in patients with classic hemophilia treated with cryoprecipitate and lyophilized concentrates. *N. Engl. J. Med.*, **308**; 83~86, 1983.
- 10) Davis, K.C., Horsburgh, C.R., Hashiba, U. et al.: Acquired immunodeficiency syndrome in a patient with hemophilia. *Ann. Intern. Med.*, **98**; 284~286, 1983.

- 11) Poon, M.C., Landay, A., Prasthofer, F. et al.: Acquired immunodeficiency syndrome with *Pneumocystis carinii* pneumonia and *Mycobacterium avium*-intracellular infection in a previously healthy patient with classic hemophilia. Clinical, immunologic and virologic findings. *Ann. Internl. Med.*, **98**; 287~290, 1983.
- 12) Elliot, J.L., Hoppes, W.L., Platt, M.S. et al.: The acquired immunodeficiency syndrome and *Mycobacterium avium*-intracellular bacteremia in a patient with hemophilia. *Ann. Intern. Med.*, **98**; 290~293, 1983.
- 13) 広見義光, 吉村祐一, 三宅和彦, 他: *Campylobacter fetus* による敗血症を起こした血友病Aの1例, 第329回日本内科学会 関東地方会口演, 東京, 1983.
- 14) 仁保喜之: ヒト骨髄細胞による *in vitro* コロニー形成法. 免疫実験操作法, VII. p. 933~938, 日本免疫学会, 1979.
- 15) Goldsmith, J.C., Moseley, P.L., Monick, M. et al.: T-lymphocytes subpopulation abnormalities in apparently healthy patients with hemophilia. *Ann. Intern. Med.*, **98**; 294~296, 1983.

●細胞分化の正常と異常!

血液細胞の分化と増殖—基礎と臨床—

編集 自治医科大学学長 中尾喜久 自治医科大学教授 高久史麿
専門医21氏分担執筆

A 5 判 251頁 図126 表47 定価4,800円(〒200円)

血液細胞とその分化は近年における血液学の中で最も目覚ましい発展をとげた分野である。造血臓器では分化という過程が胎生期のみならず成体にも営まれ、現在医学の当面している重大な問題である「細胞の癌化」にも密接な関係をもっている。本書は今までの歴史的展望、世界の現況を概説し、わが国での第一線の優れた研究をまとめた良書である。

●内容: 1. 幹細胞研究の歴史的展望, 2. 骨髄増殖性疾患における幹細胞の変動, 3. 小児血液疾患における造血幹細胞の動態, 4. Erythropoietin研究の最近の進歩, 5. 赤血球系細胞の分化, 6. 造血幹細胞の増殖分化機構の異常としての白血病発症機構の実験的研究, 7. 尿エリトロポエチンの免疫化学的研究, 8. 造血幹細胞の増殖に及ぼす各種異種抗血清の影響, 9. 無形成骨髄の造血回復機構—大動脈吻合パラボジオーシスによる白血球分化の研究—, 10. 造血の“場”の概念とその役割, 11. 造血細胞のピリミジン代謝調節, 12. 造血細胞のDNA合成の調節, 13. T-リンパ球の分化, 14. ヒトリンパ系細胞の分化と成熟—臨床例の検討からの考察—。