無(低)ガンマグロブリン血症患児の pokeweed mitogen 誘導 免疫グロブリン産生における T 細胞および B 細胞機能

近 藤 直 実・久 野 保 夫・折 居 忠 夫

**Functions of T cells and B cells of a(hypo)-gammaglobulinemia patients
in pokeweed mitogen induced immunoglobulin production system**

Naomi Kondo, Yasuo Kuno, Tadao Orii

Department of Pediatrics, Gifu University School of Medicine

【Summary】

Functions of T cells and B cells of a(hypo)-gammaglobulinemia patients were investigated, using pokeweed mitogen (PWM) induced immunoglobulin production system. As the B cell competence is required for T cell help among allogeneic individuals, T cells or B cells were tested in co-cultures not only with B cells or T cells of the third party individuals but also with B cells or T cells of patient family members. Detections of immunoglobulin secreting cells were performed by plaque assay using protein A coated sheep red blood cells. In three of four cases with common variable immunodeficiencies, B cell functions were disturbed, in another case T cell helper or suppressor function was disturbed and B cell function was slightly disturbed. In two cases with Bloom's syndrome and one case with 18 ring chromosome, B cell functions were disturbed.

Key words : a(hypo)-gammaglobulinemia
pokeweed mitogen induced immunoglobulin production
functions of T cells and B cells
plaque forming cell

【概 要】

原発性免疫不全症のうち、無(低)ガンマグロブリン血症患者の pokeweed mitogen (PWM) 誘導免疫グロブリン産生における T 細胞および B 細胞機能につき検索した。この系における同種の T・B 細胞間には適格性が存在することから、父母・兄弟を含めた複数以上の同種との組み合わせにより評価した。また、免疫グロブリン分泌細胞の検出はプロテイン A 結合ヒツジ赤血球を用いたブラック法により行なった。その結果、common variable immunodeficiency 4

例のうち3例はB細胞機能障害が、残りの1例はT細胞（ヘルパーまたはサプレッサー）機能障害および軽度のB細胞機能障害が考えられた。Bloom 症候群の2例ではB細胞機能に、また18番環状染色体の1例ではB細胞機能のうち特にIgA分泌細胞への分化にそれぞれ異常が存在すると考えられた。現在はこのようなB細胞機能異常の異質性の存在と解析につき検討中である。

I. 緒 言

原発性免疫不全症のうち無（低）ガンマグロブリン血症の病像を呈する病型は種々みられ、その病態は複雑多岐にわたる。著者ら^{1,2,3)}はこれらの病態を解明し分類整理するために、以前より検討を行なってきたが、今回はこれらの患児の pokeweed mitogen (PWM) 誘導免疫グロブリン産生系におけるT細胞およびB細胞機能につき検討した。

II. 対 象

健康人、無（低）ガンマグロブリン血症を示す患児、およびこれらの家族を対象とした。患児は7例で、P₁, P₂, P₃ および P₄ は common variable immunodeficiency でそれぞれ12歳、3歳、7歳、5歳であり、P₅ および P₆ は Bloom 症候群でそれぞれ12歳、10歳で同胞であり、P₇ は18番環状染色体で10歳である。なお、P₆ および P₇ は女児で、それ以外は男児である。患児らの末梢リンパ球数および血清免疫グロブリン値を表1に示した。

III. 方 法 (図1)

末梢血から Ficoll-paque を用いた比重遠心法によりリンパ球・単球分画 (PBL) を得、さらに、ノイラミニダーゼ処理ヒツジ赤血球を用いたエロゼット法により T cell rich 分画 (T細胞) と B cell rich 分画 (B細胞)

とに分離した。

RPMI 1640 溶液に 10 mM の HEPES (N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), 2 mM の L-glutamine, 100 IU/ml の penicillin, 100 µg/ml の streptomycin および 15% の 56°C 30 分処理胎児ウシ血清 (FCS) を添加したものを培養液として使用し、上記のT細胞あるいはB細胞を 1×10^6 /ml の割合で培養液に浮遊させ、T細胞とB細胞の各 1×10^5 個を種々の同種の組み合わせでマイクロUプレート (A/S, Nunc) 内で 25 µg/ml の PWM 存在下あるいは非存在下にて、7日間、37°C 5% CO₂ 培養器で培養した。培養液交換は培養4日目に PWM の入っていない培養液で行なった。培養終了後、各ウェルごとに細胞を採取し、MEM (minimum essential medium) で細胞を洗浄し 1 ml の MEM に浮遊させた。

免疫グロブリン (Ig) 分泌細胞の検出は、著者ら^{1,3)}が既に報告したプロテインA結合ヒツジ赤血球を用いたブラック法により行なった。詳細は文献に譲るが、要するに、プロテインA (0.5 mg/ml) (Pharmacia) を CrCl₃·6 H₂O を用いてヒツジ赤血球に結合させた。次いで細胞浮遊液 0.1 ml, プロテインA結合ヒツジ赤血球浮遊液 (25% の MEM 浮遊液) 0.05 ml, 抗ヒト Ig 血清 0.025 ml およびモルモット補体 0.025 ml を混合し、その 0.1 ml を Cunningham チャンバー内に入れパラフィンで封じ、37°C で6~12時間インキュベートし、肉眼でプラ

表 1 Lymphocyte counts and serum Ig levels on patients

Patients (Age)	Peripheral lymphocyte counts (/mm ³)	Serum Ig levels (mg/dl)			
		IgG	IgM	IgA	
Common variable immunodeficiency					
P ₁ (12yr)	2200	28	26	trace	
P ₂ (3yr)	2310	21	27	trace	
P ₃ (7yr)	2610	65	5.5	9.9	
P ₄ (5yr)	3315	380	27	28	
Bloom's syndrome					
P ₅ (12yr)	1975	940	27	79	
P ₆ (10yr)	1770	1009	35	96	
18 ring chromosome					
P ₇ (10yr)	2438	2080	102	35

図 1 Procedure

表 2 Effect of T cells and PWM on the development of Ig secreting cells in autologous B cells

Lymphocytes	PWM	Number of Ig secreting cells (PFC/well)		
		IgG	IgM	IgA
1×10^5 B cells	(-)	40 ± 28	n. d. ^{a)}	20 ± 28
1×10^5 T cells	(-)	20 ± 14	n. d.	n. d.
1×10^5 T cells + 1×10^5 B cells	(-)	380 ± 28	150 ± 14	286 ± 42
1×10^5 B cells	$25 \mu\text{g/ml}$	60 ± 28	20 ± 0	90 ± 98
1×10^5 T cells	$25 \mu\text{g/ml}$	30 ± 14	10 ± 14	28 ± 14
1×10^5 T cells + 1×10^5 B cells	$25 \mu\text{g/ml}$	5788 ± 156	5662 ± 160	6502 ± 460

a) n. d.: not detectable

ック形成細胞 (PFC) 数を算定した。なお、抗ヒト Ig 血清として抗ヒト γ 鎖血清、抗ヒト μ 鎖血清、抗ヒト α 鎖血清を使用した時に出現する PFC を、それぞれ IgG, IgM, IgA 分泌細胞とした。また、使用した抗血清の特異性は免疫電気泳動などにより確かめた。

すべての測定は triplicate あるいは duplicate で行ない、PFC 数は主としてウェルあたりで示した。また、一部の成績は対照群の PFC 数に対する実験群の PFC 数を百分率で示した。すなわちそれは次式で得られる。

$$\% \text{PFC} = \frac{\text{実験群の PFC 数}}{\text{対照群の PFC 数}} \times 100$$

この場合、実験群の PFC 数とは PWM 存在下において B 細胞と T 細胞とが同種の組み合わせの場合であり、対照群の PFC 数とはそれらが自己の組み合わせの場合の PFC 数である。

IV. 成績

(1) PWM 誘導 B 細胞 Ig 分泌における T 細胞ヘルプの必要性：

表 2 に示されるように、健康人の B 細胞の PFC 数は B 細胞に自己 T 細胞と PWM を加えた時に各クラスとも著しく増加した。

以下の成績は PWM を用いた系での結果である。

(2) B 細胞の Ig 分泌における B 細胞と T 細胞との最適比：

表 3 に示されるように、健康人において B 細胞と自己 T 細胞との比が 1:1 の時に PFC 数は各クラスとも最も高い値を示した。

したがって、以下の実験はこの比で組み合わせた成績である。

(3) 健康人、無 (低) ガンマグロブリン血症患児およびこれらの家族における B 細胞と自己 T 細胞との組み合わせで得られる Ig 分泌細胞数：

表 4 に示されるように、全体的には患児においては健康人および家族に比していずれのクラスの Ig 分泌細胞数も低値を示した。特に P_1 , P_2 , P_3 および P_4 の common variable immunodeficiency ではほとんど有意のブラック数は認められなかった。 P_5 および P_6 の Bloom 症候

表 3 Effect of the T to B cell ratio on the development of Ig secreting cells in PWM-induced Ig production

Number of cells (/well)		Number of Ig secreting cells (PFC/well)		
T cells	B cells	IgG	IgM	IgA
0	1×10^5	60	20	90
2.5×10^4	1×10^5	1000	1538	1082
5×10^4	1×10^5	3024	3434	2598
1×10^5	1×10^5	5788	5662	6502
2×10^5	1×10^5	3662	4536	4760

表 4 Number of Ig secreting cells in B cell populations after co-culture with autologous T cells

Donor of T and B cells		Number of Ig secreting cells (PFC/well)		
		IgG	IgM	IgA
Healthy individuals				
H ₁		4280 ± 212	1880 ± 201	1500 ± 78
H ₂		11400 ± 1026	2760 ± 168	1880 ± 9
H ₃		5940 ± 255	5820 ± 180	6960 ± 223
H ₄		4150 ± 98	3450 ± 212	890 ± 14
H ₅		7020 ± 235	4840 ± 338	920 ± 28
H ₆		7380 ± 780	6000 ± 240	5140 ± 620
H ₇		1920 ± 130	2640 ± 84	4320 ± 296
H ₈		14880 ± 1920	5580 ± 1260	8260 ± 280
H ₁ M mother of H ₃		7240 ± 254	3030 ± 98	5430 ± 70
H ₇ M mother of H ₇		21000 ± 1320	8640 ± 285	14880 ± 2200
H ₇ F father of H ₇		19920 ± 638	5160 ± 296	17280 ± 880
P ₁ M mother of P ₁		10370 ± 524	3830 ± 156	2980 ± 282
P ₂ M mother of P ₂		10800 ± 648	1900 ± 68	3960 ± 356
P ₃ M mother of P ₃		21300 ± 532	4060 ± 203	3780 ± 200
P ₃ F father of P ₃		4280 ± 212	1880 ± 201	1500 ± 78
P ₄ M mother of P ₄		4020 ± 1700	3680 ± 170	3120 ± 130
P ₄ F father of P ₄		10740 ± 1080	5920 ± 920	4360 ± 150
P ₅ M mother of P ₅		12090 ± 556	3210 ± 693	2690 ± 14
P ₇ M mother of P ₇		6660 ± 370	1500 ± 78	900 ± 35
P ₉ F father of P ₉		14340 ± 701	3060 ± 69	3020 ± 121
Patients				
P ₁ CVI	(12yr)	30 ± 14	n. d.	n. d.
P ₂ CVI	(3 yr)	n. d.	n. d.	n. d.
P ₃ CVI	(7 yr)	30 ± 14	10 ± 14	10 ± 14
P ₄ CVI	(5 yr)	n. d.	n. d.	n. d.
P ₅ Bloom's syndrome	(12yr)	170 ± 42	110 ± 14	120 ± 28
P ₆ Bloom's syndrome	(10yr)	280 ± 54	580 ± 100	440 ± 62
P ₇ 18ring chromosome	(10yr)	1560 ± 80	1100 ± 23	200 ± 34

n. d.: not detectable

CVI: common variable immunodeficiency

Cell source T—B	% PFC		
	IgG 100	IgM 100	IgA 100
H4—H4 H4—P1			
P2M—P2M P2M—P2			
P3M—P3M P3M—P3			
P4M—P4M P4M—P4			
P5M—P5M P5M—P5			
P5M—P5M P5M—P6			
P7M—P7M P7M—P7			

図 2 Function of B cell in PWM induced immunoglobulin production system

1×10^5 B cells were co-cultured with allogeneic T cells (1×10^5) and PWM.

$$\% \text{PFC} = \frac{\text{Numbers of PFC in experimental culture}}{\text{Numbers of PFC in control culture}} \times 100$$

群では IgG, IgM および IgA とも全体に低値を示した。P₇ の 18 番環状染色体では IgG および IgM は軽度に低下しており, IgA がこれらに比し著しく低値を示した。

(4) 無(低)ガンマグロブリン血症患児の PWM 誘導免疫グロブリン産生系における T 細胞および B 細胞機能:

著者ら^{1,4)}が既に報告してきたように, PWM 誘導免疫グロブリン産生系においてもヒト同種 T—B 細胞間に適格性が存在すること, および, この系を用いて T 細胞・B 細胞の機能を評価する場合には父母・兄弟との T・B 細胞の組み合わせの適格性が比較的良好であること, また, 組み合わせを増すことにより信頼性が高まることから, 今回は, 患児の T 細胞または B 細胞をこれらの家族を含めた同種の B 細胞または T 細胞と組み合わせるこれらの機能を評価した。1 名の患児については 3 名から 5 名の健康人から得た細胞と組み合わせた。図 2 および図 3 にはその成績のうち代表的なものを呈示した。

図 2 は患児の B 細胞機能を評価したものであり, 図 3 は T 細胞機能を評価したものである。いずれも % PFC で表わした。Common variable immunodeficiency のうち P₁, P₂ および P₃ は T 細胞ヘルパー機能は充分保たれていたが B 細胞機能に障害が認められた。P₄ は現在のところどの組み合わせにおいても T 細胞ヘルパー機能が認められず, 一方, B 細胞機能はある程度は認められた。Bloom 症候群の P₅ および P₆ では T 細胞ヘルパー機能は充分認められたが B 細胞機能はほとんど認められなかった。以上の症例では IgG, IgM および IgA について同

Cell source T—B	% PFC		
	IgG 100	IgM 100	IgA 100
P1M—P1M P1—P1M			
P2M—P2M P2—P2M			
P3M—P3M P3—P3M			
P4M—P4M P4—P4M			
P5M—P5M P5—P5M			
P5M—P5M P6—P5M			
P7M—P7M P7—P7M			

図 3 Function of T cell in PWM induced immunoglobulin production system

1×10^5 T cells were co-cultured with allogeneic B cells (1×10^5) and PWM.

$$\% \text{PFC} = \frac{\text{Numbers of PFC in experimental culture}}{\text{Numbers of PFC in control culture}} \times 100$$

一の成績が得られた。18 番環状染色体の P₇ では T 細胞のヘルパー機能は充分認められたが, B 細胞については IgG と IgM に関しては異常を認めなかった, しかし, IgA の分泌細胞数が低値を示し, IgA 分泌細胞への分化障害が考えられた。

V. 考 按

ヒトリンパ球の in vitro における PWM 誘導免疫グロブリン産生系はきわめて再現性が高く, この系における T 細胞の Ig 産生は T 細胞に依存していることが示されている⁵⁾。しかし, この系では既に著者ら^{1,4)}が報告したように, 同種 T—B 細胞間に適格性が存在する。この適格性の理由の詳細については今のところ明らかでないが, 少なくとも HLA-A, -B, -C および -DR 抗原とは関係がないようである。このような現状において無(低)ガンマグロブリン血症患児の T 細胞・B 細胞機能を評価するには, マイトマイシン C などで T 細胞を前処理しておいてから同種の B 細胞と組み合わせる⁷⁾か, または, 著者ら^{1,4)}が既に報告したように, T 細胞をそのまま父母兄弟を含めて数人以上の同種の B 細胞と組み合わせるかのふたつの方法がある。しかし, 前者のような前処理を行なう場合には, T 細胞機能を in vivo より近い状態で評価するという点において劣っていることから, 後者のような組み合わせにより評価することが有用であると考えられる。今回は, このような方法を用いて無(低)ガンマグロブリン血症を呈する患児の T 細胞・B 細胞機能について検索した。

厚生省「免疫不全症候群に関する研究班」の調査⁹⁾でも, common variable immunodeficiency は最も頻度の高いものであり, その名の通り病態は多彩である。Waldmann ら⁷⁾は, この範疇に入る症例を検索し, T細胞とくにサブプレッサーT細胞機能異常が少なからず存在することを報告したが, 今回の4例では, 先に述べたような数人以上の同種の細胞と組み合わせを行なったところ, 4例中3例はB細胞機能異常が考えられ, 残りの1例(P₄)のみにT細胞(ヘルパーまたはサブプレッサー)機能異常が考えられた。しかし, このP₄のB細胞機能も充分とはいえず, また, Rosen のグループ^{8,9)}はB細胞の Epstein-Barr ウイルスに対するレセプターの欠損している症例や IgG の heavy 鎖のグリコシル化障害の存在する症例を報告しており, B細胞機能異常による無(低)ガンマグロブリン血症もまた多いものと考えられた。

Bloom 症候群の2例ではB細胞機能に, また18番環状染色体の1例ではB細胞機能のうちとくに IgA 分泌細胞への分化に異常が存在することが示された。後者では, 血清免疫グロブリン値も IgA のみ低下を示していることから今回の成績とよく一致するものと考えられた。

以上のように, 無(低)ガンマグロブリン血症を呈する病型は種々あるが, とくにB細胞機能に異常がみられるものが多く, 現在著者らはこれらのB細胞機能異常の異質性の存在と解析に注目して研究を進めている。

本論文の一部は, 第84回日本小児科学会総会(1981年5月, 徳島)において発表した。

本研究の一部は, 文部省科学研究費, および, 厚生省「免疫不全症候群に関する研究班」の研究費によった。

文 献

- 1) 近藤直実・折居忠夫・植竹久雄: Pokeweed mitogen 誘導免疫グロブリン産生系におけるヒト同種 T-B 細胞間の適格性の存在とその解析. アレルギー 30: 281-288, 1981.
- 2) 近藤直実・小崎 武: 原発性免疫不全症の病態と治療に関する研究. 日児誌 82: 1290-1296, 1978.
- 3) Kondo, N., Uetake, H.: Effect of human T cell culture supernatants on polyclonal immunoglobulin secretion of lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. Ann. Rep. Inst. Virus. Res. Kyoto Univ. 22: 29-34, 1979.
- 4) Kondo, N., Uetake, H.: Competence of B cells for T cell help in pokeweed mitogen-induced immunoglobulin production. Ann. Rep. Inst. Virus Res. Kyoto Univ. 22: 34-40, 1979.
- 5) Keightley, R.G., Cooper, M.D., Lawton, A.R.: The T cell dependence of B cell differentiation induced by pokeweed mitogen. J. Immunol. 117: 1538-1544, 1976.
- 6) 厚生省特定疾患「免疫不全症候群に関する研究班」昭和55年度報告書(班長・矢田純一) p 9, 1981.
- 7) Waldmann, T.A., Durm, M., Broder, S., Blackman, M., Blaese, R.M. and Strober, W.: Role of suppressor T cell in pathogenesis of common variable hypogammaglobulinemia. Lancet 2: 609-613, 1974.
- 8) Schwaber, J.F., Klein, G., Ernberg, I., Rosen, A., Lazarus, H. and Rosen, F.S.: Deficiency of Epstein-Barr virus (EBV) receptors on B lymphocytes from certain patients with common varied agammaglobulinemia. J. Immunol. 124: 2191-2196, 1980.
- 9) Ciccimara, F., Rosen, F.S., Schneeberger, E.E. and Merler, E.: Failure of heavy chain glycosylation of IgG in some patients with common variable agammaglobulinemia. J. Clin. Invest. 57: 1386-1390, 1976.