

&lt;原 著&gt;

## Protein A結合羊赤血球を用いた、プラーク法による免疫グロブリン 分泌細胞の検出 — 各種免疫不全疾患における成績 —

大阪赤十字病院 小児科<sup>1)</sup>, 同 検査部<sup>2)</sup>, 同 内科<sup>3)</sup>, 濱田小児科<sup>4)</sup>田中晴樹<sup>1)</sup> 森田耕輔<sup>1)</sup> 鶴和美穂<sup>1)</sup> 宋 大光<sup>1)</sup> 杉峰啓憲<sup>1)</sup> 坂本晴子<sup>1)</sup> 濱田実保<sup>1)4)</sup> 葭井操雄<sup>1)</sup>  
森本武志<sup>1)</sup> 住本真一<sup>1)</sup> 山本英彦<sup>1)</sup> 金岡裕夫<sup>1)</sup> 新居正甫<sup>1)</sup> 伊藤容子<sup>2)</sup> 河村ゆき江<sup>2)</sup> 友野尚美<sup>3)</sup>

### Hemolytic Plaque Assay for human Immunoglobulin Secreting Cells using Sheep Red Blood Cells. — Studies in various Immunocompromised Patients —

Haruki TANAKA<sup>1)</sup>, Kousuke MORITA<sup>1)</sup>, Miho TSURUWA<sup>1)</sup>, Daiko SO<sup>1)</sup>,  
Yoshinori SUGIMINE<sup>1)</sup>, Haruko SAKAMOTO<sup>1)</sup>, Miho HAMADA<sup>1)4)</sup>, Misao YOSII<sup>1)</sup>,  
Takeshi MORIMOTO<sup>1)</sup>, Shinichi SUMIMOTO<sup>1)</sup>, Hidehiko YAMAMOTO<sup>1)</sup>,  
Hiroo KANAOKA<sup>1)</sup>, Masahiko NII<sup>1)</sup>, Youko ITO<sup>2)</sup>, Yukie KAWAMURA<sup>2)</sup>,  
Naomi TOMONO<sup>3)</sup>*Department of Pediatrics<sup>1)</sup>, Laboratory branch<sup>2)</sup>, Internal Medicine<sup>3)</sup> and  
Hamada Children's Clinic<sup>4)</sup>  
Osaka Red Cross Hospital*

Key words : プロテインA, 免疫グロブリン分泌細胞, 原発性免疫不全症候群

#### はじめに

我々は、1979年より、主に原発性免疫不全症候群に対してPokeweed Mitogen (PWM) を使用した抗体産生能につき検討を重ねてきたが<sup>1)2)</sup>、今回リンパ球系悪性疾患、膠原病なども対象に検討を加えたのでその結果を報告する。

#### 方 法

##### 1. リンパ球の培養とプラーク法

基本的には、前編(投稿中)に述べたごとくGronowiczらの方法<sup>3)</sup>に準拠した。

##### 2. Neuraminidase処理羊赤血球 (N-treated SRBC)

Neuraminidase (500u/ml) を0.02mlと羊赤血球 (SRBC) ( $2 \times 10^{10}$ /ml) の0.1mlとを混和し37°Cで1時間培養した。この処理SRBCを10%FCS加RPMI1640で $5 \times 10^8$ /mlに調整し、各種疾患の単核球とでロゼット形成を

作成した。

##### 3. T, B細胞の分離

上記ロゼットを形成した単核球をFicoll-Conray法で分離し、ロゼット非形成細胞をB細胞、形成細胞は塩化アンモニウム (0.83%NH<sub>4</sub>Cl) で急速に溶血のうえ洗浄を繰り返す、これをT細胞とした。各々 $0.5 \times 10^5$ 個のリンパ球を使用した。

##### 4. T細胞のヘルパー能、サプレッサー能とB細胞の分化能

上記T, B細胞を患者、健康成人共 $0.5 \times 10^5$ 個ずつで混和し培養した。また一部T細胞を患者、健康成人で更に半量 ( $0.25 \times 10^5$ 個) 混和し培養した。p1, p2はそれぞれ異なった患者を示し、n1, n2も異なった健康成人よりの採取単核球を示す。なお通常の羊赤血球、補体結合羊赤血球とのロゼット形成は矢田らの方法<sup>4)</sup>に準拠し、各々E-R, EAC-Rと表記した。

## 結 果

## 1. 原発性免疫不全症候群 (IDS)

IDS 5 例について初診時に検討した (表 1)。SCID 例は母親由来の IgG のみならず, IgA, IgM とともに正常域であったが, PFC でみると殆ど免疫グロブリンを産生せず, 他の検査結果も含め SCID と診断しえた。HIM 例は血

清では IgM の高値をみたが, PFC では IgM も含め産生がなく, ガンマグロブリンの補充療法後は, 顆粒球減少も IgM 高値も消失した。図 1 に同時検査のコントロールとの比率を示したが, WAS, CVID, CMCC とともに relative な T 細胞機能障害例では, その程度に応じて抗体産生がみられた。さらに詳しく調べるため T, B リンパ球を分離して検討を加えた

表 1 原発性免疫不全症候群と検査結果

症例	診断	年齢	性	血清IgG	血清IgA	血清IgM	E-R	EAC-R	IgGPFC	IgAPFC	IgMPFC
1	Hyper IgM Syndrome	02y05m	男性	70	77	186	51	36.8	87	130	7
2	SCID	00y04m	男性	445	32	42	5	17.8	13	0	0
3	WAS	05y10m	男性	795	194	19	38.7	6.1	1531	75	240
4	CVID	55y	女性	447	19	15	51.9	3.9	3382	323	400
5	CMCC	02y01m	女性	1201	45	86	40.5	19.2	31	0	456

- (1) 血清免疫グロブリン: mg/dl  
 (2) E-R, EAC-R: %  
 (3) プラーク形成細胞 (PFC): 但し  $1 \times 10^6$  個生細胞当たりの産生数  
 (4) Hyper IgM Syndrome: 高IgM症候群 (HIM)  
 SCID: 重症複合型免疫不全症  
 WAS: ウィスコット・オールドリッチ症候群  
 CVID: 分類不能型  
 CMCC: 慢性皮膚粘膜カンジダ症

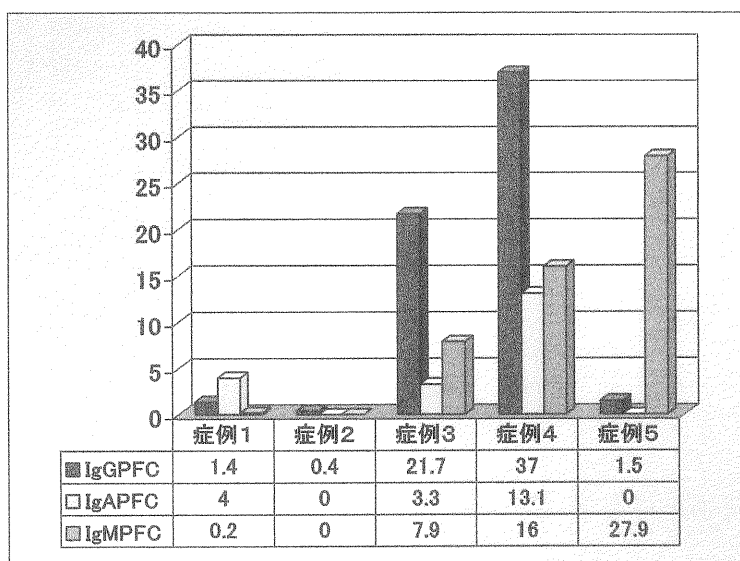


図 1 原発性免疫不全症候群の健康成人コントロールに対する比率 (%)

- 症例 1: Hyper IgM Syndrome (HIM)  
 症例 2: SCID  
 症例 3: WAS  
 症例 4: CVID  
 症例 5: CMCC

表2 原発性免疫不全症候群：T, B細胞分離後の免疫グロブリン産生細胞数 (PFC) ただし  $1 \times 10^6$ 個単核球当たりの細胞数で表記

症例	1		2		3		4		5	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
Patient	0	0	13	0	282	621	3382	400	59	88
Control	17273	12545	5255	3419	4077	1407	9144	2503	4077	1407
Mixed	nd	nd	733	62	3187	2419	13350	11406	378	582
(Mixed)対照	nd	nd	7826	2758	nd	nd	22487	35155	nd	nd
pT+pB	64	0	0	0	nd	nd	nd	nd	219	29
nT+nB	7283	4257	2578	1398	7676	1164	nd	nd	7676	1164
pT+nB	1053	17	327	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
n1T+n2B	4943	152	6670	1282	nd	nd	nd	nd	nd	nd
pT,nT+nB	2858	257	6886	705	nd	nd	nd	nd	nd	nd
n1T,n2T+nB	3690	947	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nT+pB	48	0	0	16	1133	1609	nd	nd	803	952

症例1: Hyper IgM Syndrome (HIM)

症例2: SCID

症例3: WAS

症例4: CVID

症例5: CMCC

p: 患者リンパ球

n: 健康成人リンパ球

T: Tリンパ球

B: Bリンパ球

Mixed: 混合培養, (Mixed) 対照: 健康成人二人の混合培養

(n.d.: not done.)

(表2)。pT, nTにnBを混合した成績とn1Tとn2Bとの成績と差がなく, SCIDとHIM例ではそのサプレッサーT細胞による抗体産生障害は否定でき, pTとnBで産生がみられないことより, ヘルパーT細胞の異常と思われる。またともにB細胞機能の障害 (nT+pB)も認めた。WAS, CMCC例については, IgM PFCは各々コントロールの138%, 82%であるのに対し, IgGPFCは14.8%, 10.5%と低値をとった。

## 2. 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE)

SSPE 3例中2例につき, その病初期に検討した (表3)。T, Bリンパ球の数的異常はなく, 主にT細胞のヘルパー機能の異常を思わせた。その後トランスファーファクター (TF), インターフェロン (IF) などを使用した, 最終転帰は2例死亡で1例のみ生存している。

## 3. リンパ球系悪性疾患

初診症例6例につき検討した (表4)。症

表3 SSPEと免疫学的検査結果 但し ( ) は健康成人と比較した%

症例		1	2
年齢		08y10m	10y03m
性		女性	女性
遅延型	PPD	0/0×0	0/4×2
皮膚反応	Candida	12×10/23×23	0/0×0
表面	E-R	67.8	50.5
マーカー	EAC-R	10.5	10.5
PFC	IgG	1396(35%)	327(2.5%)
	IgA	137(49%)	36(9.5%)
	IgM	27(1.5%)	109(1.8%)
Mixed	IgG	2053(73%)	14309(108%)
	IgA	169(78%)	1877(27.4%)
PFC	IgM	1958(188%)	6444(106%)
転帰		死亡:28歳	生存:33歳

例2は, 骨髄細胞での検討ではT細胞の欠如によるPFC産生欠損であり, 末梢血での検討では残存B細胞は比較的PFC産生可能なことを示した。症例3, 症例4は, T細胞系NHLだが, 検体材料は腹水ではほぼ腫瘍細胞

で占められていると思われるが、T、B細胞分離での検討(図2)では、ヘルパー機能の低下は見られるが、まだ比較的残存していると考えられ、患者自身のPFC産生欠損の理由としては、EAC-RイコールB細胞といえず、単純に患者B細胞の絶対数の減少によるものかもしれない。

4. 長期生存急性リンパ球性白血病(ALL)

抗癌剤治療がなされた場合、比較的長期にわたってその免疫能の低下がいわれているが<sup>5)6)</sup>、抗体産生系でみる限りは、6年ではほぼ正常化をみている(表5)。症例2は再発

後治療中のためと思われるが、患者自身のPFCでは殆ど産生欠損といえる状況であることより、早期の再発予知の可能性もありうると思われる。

5. 膠原病

SLE 2例については、共に活動期での検索なるも、症例1ではPFC数の増加、症例2では軽度抑制を思わせた(表6)。SLEではサプレッサーT細胞機能の低下、PWMシステムでの反応性の低下<sup>7)</sup>が報告されているが、症例2では混合培養で回復がみられ、ヘルパーT細胞の機能低下も思わせた。

表4 各種リンパ球系悪性疾患におけるPFC (空欄：未施行)

症例	1	1	2	2	3	4	5	6
診断	NHL	NHL	ALL	ALL	NHL	NHL	NHL	CLL
年齢	67	67	3	3	52	84	48	68
Specimen	PB	胸水	PB	BM	腹水	腹水	PB	PB
% of Blasts	13		56	96.4			6	
E-R(%)	28	4.05	27.5	12.8	60.4	61	38.7	10.2
T-Lymph	401		2277					
EAC-R(%)			7		4.3	5.2	6.1	
B-Lymph			580					
IgGPFC	14	29	870	0	0	0	1531	16
% of Control	0.03	0.1	8.1	0	0	0	21.7	0.2
IgM PFC	0	0	2462	98	52	44	233	0
% of Control	0	0	72.5	2.9	0.6	1	7.6	0
IgGPFC:混合培養		5956	16033		17684		8174	
IgMPFC:混合培養		885	11169		10105		3995	

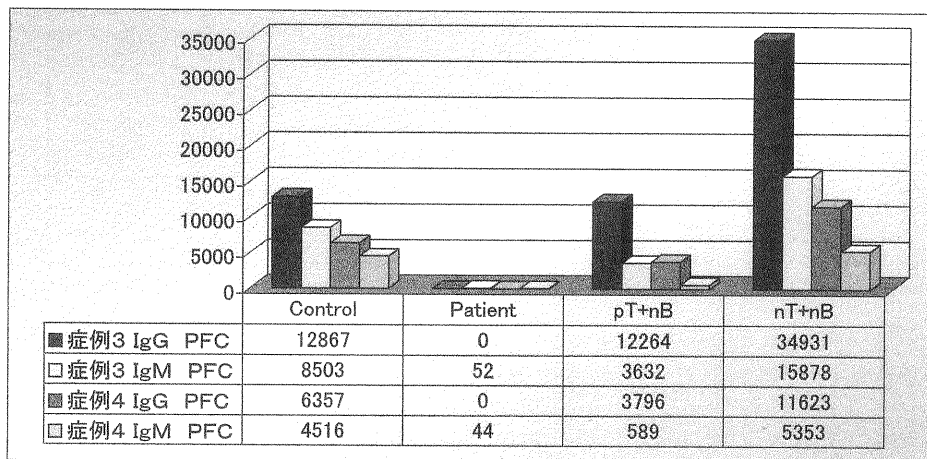


図2 NHLにおけるT、Bリンパ球分離によるPFC

表5 ALL 5年以上長期生存例の免疫学的検査結果

症例	1	1	2	2	3	4	5	6
診断	NHL	NHL	ALL	ALL	NHL	NHL	NHL	CLL
年齢	67	67	3	3	52	84	48	68
Specimen	PB	胸水	PB	BM	腹水	腹水	PB	PB
% of Blasts	13		56	96.4			6	
E-R(%)	28	4.05	27.5	12.8	60.4	61	38.7	10.2
T-Lymph	401		2277					
EAC-R(%)			7		4.3	5.2	6.1	
B-Lymph			580					
IgG PFC	14	29	870	0	0	0	1531	16
% of Control	0.03	0.1	8.1	0	0	0	21.7	0.2
IgM PFC	0	0	2462	98	52	44	233	0
% of Control	0	0	72.5	2.9	0.6	1	7.6	0
IgG PFC:混合培養		5956	16033		17684		8174	
IgM PFC:混合培養		885	11169		10105		3995	

\* : ただし2年11ヶ月で骨髄再発, 5年0ヶ月でCNS再発。  
また検査後2ヶ月で骨髄再発。(治療中)

考察ならびに結論

歴史的には、免疫機能の解析に細胞相互作用から表面マーカーとサイトカインの解析に、そして現在では分子レベルの解析とレセプターの解析、さらにはその遺伝子レベルの解析と変遷をみているが、最終的には細胞レベルの問題として帰還すべきと考えられる。

血清免疫グロブリンはtotalな経過の総合値を意味し、PWMシステムでのPFC数は検査した時点でのより正確な抗体産生能を反映しているものと考えられる。<sup>8)</sup>ただこのシステムでは単球の抗原呈示を必要とし、また小児期ではサプレッサーT細胞の誘導も報告<sup>9)</sup>されており、さらに正確さを期するならば、単球も分離したうえでの混合培養とか、EBVによるB細胞機能の評価が必要とされるであろう。ただし臨床的に見る限り報告したようにその診断と治療経過での評価(未発表)への有用性は認められると思われる。

IDS例での検討では、SCID例はB細胞は数的には存在するがその機能はなく、T細胞は殆ど存在せず、T、B両細胞障害を認めた。また他のIDS症例では、そのT細胞機能障害の程度に応じて抗体産生能の低下を確認しえた。なお

表6 SLE例のプラーク形成能 (n.d.: not done.)

症例	1	2	
年齢	14	10	
蝶形紅斑	陽性	陽性	
レイノー現象	陰性	陰性	
関節痛	陽性	陽性	
蛋白尿(gm/日)	0.2	0.81	
ワ氏反応	陰性	陽性	
リンパ球数(/cmm)	1280	703	
LE現象	陽性	陽性	
直接クームス	陽性	陰性	
抗核抗体	640倍	640倍	
Wire-loop Lesion	陰性	陽性	
IgG	2589	1009	
IgA	360	182	
IgM	140	101	
C3	37	29	
C4	4	3	
Ma. R.	0/7 × 6	0/1 × 1	
検体材料	末梢血	末梢血	
ロゼット形成	E-R	45	38.2
	EAC-R	16.9	14.3
PFC	IgG	17542	6284
	IgA	14138	4025
	IgM	17673	2749
混合培養	IgG	n.d.	18173
	IgA	n.d.	8317
	IgM	n.d.	8548

各症例のT細胞機能を表7に示したが、いずれも低下傾向を認めた。HIM例ではWHO分類でクラススイッチの異常であり、B細胞機能不全とされ<sup>10)</sup>、現在遺伝子レベルでCD40Lの異常<sup>11)12)</sup>が主であることも証明されている。ただしカリニ肺炎の報告もみられ、本例のようにT細胞機能障害の併存例があることも予想される。

表7 免疫不全症候群と遅延型皮膚反応

症例	遅延型皮膚反応			
	PPD	Candida	PHA	DNCB
1	0×0	5×5	15×12	nd
2	3×2	2×2	17×17	nd
3	0×0	6×5	27×26	陰性
4	3×3	9×9	nd	1%陰性2%陽性
5	2×2	6×5	25×25	陽性

SSPE例の検討では、変異した麻疹ウイルスのみならず、患児の側の免疫異常、特にT細胞機能障害も原因として考えられた。

悪性疾患での検討では、発症時に種々の免疫異常が存在し、かつ長期生存例では長期に免疫異常が持続することも証明し得た。

SLEについては現在リツキシマブを使用してメモリーB細胞のリセットをすることで治療されつつあるが、主因は自己反応性のTリンパ球にあることは論をまたず、その病態に応じて、報告されているサプレッサーT細胞のみならず、ヘルパーT細胞、B細胞での機能障害も併存していることも予想される。このことより近年の自己幹細胞移植は、T、B両細胞のリセットを可能とする治療法であり、難治例には残された治療であると思われる。

#### 文 献

- 1) 田中晴樹, 伊藤容子, et al: リンパ球の表面マーカーと機能 (特にP.W.M.Systemについて) 日赤医学. 33:194,1981.
- 2) 田中晴樹, 新居正甫, et al: SSPE 2例, 原発性免疫不全症 2例に対するTransfer Factorの治療効果. 血液事業. 6: 163-170. 1983.
- 3) E. Gronowicz, A. Countinho, et al: A plaque assay for all cells secreting Ig of a given type or class. Eur. J. Immunol. 6: 588-590, 1976.
- 4) 矢田純一, 橘武彦: ヒトリンパ球 subpopulationの分別-ヒツジ赤血球結合性リンパ球と補体結合性リンパ球の証明法. 免疫実験操作法. II: 473-475, 1972.
- 5) V. Suvatte, M. Tuchinda: Cell-Mediated Immunity in Childhood Malignancies. J. Med. Ass. Thailand. 64: 101-108, 1981.
- 6) L. L. Roland J, L. Butler et al: Long-term Abnormalities in T and B Lymphocyte Function in Children following Treatment for Acute Lymphoblastic Leukemia. Br. J. Haematol, 49: 251-258, 1981.
- 7) 鈴木博史, 井村裕夫 et al: 全身性エリテマトーデス患者における, in vitro 免疫グロブリン産生異常の解析. 内科宝函. 30: 67-73, 1983.
- 8) 番場正博: Protein A結合ヒツジ赤血球を用いたPlaque Forming Cell Assayによる, 小児末梢血免疫グロブリン分泌細胞の検出とその意義. 日児誌. 87: 446-457, 1983.
- 9) T. Miyawaki, H. Seki et al: Suppressor Activity of T Lymphocytes from Infants assessed by Co-Culture with Unfractionated Adult Lymphocytes in the Pokeweed Mitogen System. J. Immunol. 123: 1092-1096, 1979.
- 10) D. Levitt, P. Haber et al: Hyper IgM Syndrome. A primary Dysfunction of B Lymphocyte Isotype Switching. J. Clin. Invest. 72: 1650-1657, 1983.
- 11) J. P. DiSanto, J. Y. Bonnefoy et al. CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Nature: 361: 541-543, 1993.