

原 著

正常人 T 細胞の E-rosette 形成能に及ぼす肺結核患者血清の抑制作用

池 田 俊・志 摩 清・安 藤 正 幸
徳 臣 晴比古

熊本大学医学部第1内科

受付 昭和 54 年 10 月 8 日

A STUDY ON THE INHIBITORY EFFECT OF THE SERUM FROM
PULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS ON THE E-ROSETTE
FORMATION OF NORMAL T-CELLS

Shun IKEDA*, Kiyoshi SHIMA, Masayuki ANDO and Haruhiko TOKUOMI

(Received for publication October 8, 1979)

The inhibitory effect of the serum from 14 patients with pulmonary tuberculosis on the E-rosette formation of normal donor T-cell was studied. The results obtained were as follows:

1. Some of the serum from patients with pulmonary tuberculosis inhibited the E-rosette formation of the normal T-cells, when compared with the serum from normal subjects. Five of 14 cases used in this study showed the increased inhibitory rate of more than 10 percent, and observing by the type of lesions, 4 of 7 cases with F type and one of 7 cases with C type of GAKKEN classification showed increased inhibitory rate. The mean of the inhibitory rate was 8 ± 2 percent in the serum of F type and 2 ± 1 percent in those of C type, respectively. Thus, the serum from F type showed more inhibitory effect than those of C type.
2. The serum from a case with F type which showed high inhibitory effect was fractionated into euglobulin, pseudoglobulin and albumin fractions by the ammonium sulfate saturation method, and the inhibitory effect of each fraction was studied. The inhibitory effect was found in the non- γ -globulin fractions of pseudoglobulin and albumin, but not in the euglobulin fraction.

緒 言

肺結核症患者のなかには、PPD に対する皮膚反応の低下^{1)~3)}や DNCB 被感作能の低下^{4)~8)}が認められる場合があることが従来より報告されている。また最近では、重症肺結核症患者で T 細胞の絶対数および百分比の減少⁹⁾¹⁰⁾があることなどが知られてきた。このことは、肺結核症患者の一部には、細胞性免疫機能の不全状態が存在することを示している。

一方、このような細胞性免疫機能不全状態を呈する疾患として、サルコイドーシス(以下サ症と略す)、癩などの肉芽性疾患、ループスエリテマトーデス、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患、その他慢性粘膜皮膚カンジダ症、癌などがある。これらの疾患では、リンパ状、特に T 細胞の機能を障害ないし抑制する物質が血清中に存在することが報告されている^{11)~20)}。これらの事実は、肺結核症患者の一部にみられる T 細胞の減少に、血清中の抑制因子が関与している可能性を強く示唆している。

* From the First Department of Internal Medicine, Kumamoto University Medical School, 1-1-1, Honjo, Kumamoto 860 Japan.

そこで今回、我々は健康人T細胞の E-rosette 形成を指標として、肺結核症患者血清による E-rosette 形成抑制効果について検討を試みた。

方 法

1) 対 象

熊本大学第1内科および国立療養所熊本南病院に入院した肺結核症14例を対象とした。症例構成は男性6例、女性8例で、年齢は21歳より79歳(平均56歳)、病型別分類は学研分類C型7例、F型7例であり、有排菌者は4例で、すべてF型であった(Table 1)。なお過去3カ月以内に Rifampicin (以下 RFP と略す) を服用したことがある患者は対象より除外した。

2) T細胞の分離方法

健康者よりヘパリン加末梢血を採取し、Ficoll-Conray (比重 1.078) 重層遠沈法(Böyum)によりリンパ球を分離した。すなわち血液を等量の 0.15 N 生理食塩水で希釈し、Ficoll-Conray に重層した。室温で 1,500 回転、30分間遠沈したのち、中間細胞層を採取し、0.01 M phosphate buffer saline, pH 7.30 (以下 PBS と略す) で3回洗浄した。このようにして分離したリンパ球にノイラミンダーゼ(1単位/0.5 ml, Sigma Chemical Company) で処理した²²⁾羊赤血球(以下 SRBC と略す)を加えて rosette を形成させた。次にリンパ球と SRBC を混和した細胞液を Ficoll-Conray (比重 1.110) に重層し、室温で 2,500 回転、15分間遠沈し E-rosette 形成細胞のみを管底に沈下させた。管底に落ちた E-rosette は塩化アンモニウム-トリス緩衝溶液で附着赤血球を溶血させた。この double E-rosette 重層遠沈法による T細胞の回収率は最初に得たリンパ球の40%前後であった。トリパンブルー染色法による T細胞の生存率は95%以上であった。

3) 肺結核患者および健康者血清の調製

血清は肘静脈より採取し、室温に1時間、そのあと4℃に1晩放置し、2,500回転、15分間遠沈して-20℃に凍結保存した。使用前に56℃、30分間非働化したのち、実験に供した。

4) 硫酸塩析法による血清の分離

肺結核患者と健康者の血清を硫酸アンモニウム (Mg-SO₄) でオイグロブリン分画 (0~33%) (以下 Fr-E と略す)、プソイドグロブリン分画 (33~50%) (Fr-P)、アルブミン分画 (50~70%) (Fr-A) の3分画に分けた。まず飽和硫酸溶液を作成し、各分画の飽和度に応じて飽和硫酸溶液を血清中にかくはんしながら徐々に添加した。塩析した溶液は1時間放置したのち遠心分離し、沈殿を集めた。これら沈殿分画を 1 ml の PBS に溶解したのち、Sephadex G-50 (pharmacia fine chemical) カラムクロマトグラフィーにて脱塩した。脱塩したおのおの

分画は Diaflo membrane (UM-10, > m.w. 10,000, Amicon, Corp, Lexington, Mass.) で濃縮し、PBS で1昼夜透析した。そのあと蛋白濃度を各分画一定にし、T細胞の E-rosette 形成の抑制効果を検討した。

5) E-rosette 形成抑制効果の判定方法

F型肺結核患者血清(以下 F型血清と略す)、C型肺結核患者血清(C型血清)、健康者血清および血清の硫酸分画のおおの 1 ml 中に健康者より分離した T細胞 (2 × 10⁶ cells/ml) を浮遊し、4℃ 1昼夜培養した。硫酸分画の蛋白濃度は3分画いずれも分離前の血清蛋白濃度の 1/3 量とした。培養したあと T細胞を冷-PBS にて3回洗浄し、SRBC に対する rosette 形成能を検討した。SRBC と rosette 形成した T細胞を T細胞 300 個当りの百分比で表し、SRBC が3個以上附着した細胞を E-rosette 形成陽性細胞とした。E-rosette 形成抑制効果は % inhibition (以下 % I.R.F. と略す) で算定した。% I.R.F. の算定法は下記の式によつた。

$$\% \text{ I.R.F.} = \frac{\% \text{ E-rosette (対照血清)} - \% \text{ E-rosette (患者血清)}}{\% \text{ E-rosette (対照血清)}} \times 100$$

6) 対 照

対照健康者血清は27歳の女性の血清を用い、T細胞は3例の健康者男性(年齢は24歳、27歳、35歳)のものを使用した。

7) 統計処理

成績は Mean ± SE で表し、P value は student t test を用いて算出した。

成 績

1) 肺結核患者血清の E-rosette 形成に対する抑制効果

健康者 T細胞と SRBC との rosette 形成が肺結核患者血清によつて抑制されるか否かについて検討した。すなわち分離 T細胞を血清と共に4℃、1昼夜培養し、PBS で洗浄したあと、E-rosette 形成能について検討した。結果は Table 1 に示したごとく、肺結核患者 14 例のうち、T細胞の E-rosette 形成抑制率が10%以上示したものは F型7例中4例、C型7例中1例と F型に多く認められた。肺結核患者14例の抑制率の平均値は、Table 2 に示したごとく 5 ± 1% であつた。次に C型血清と F型血清との抑制効果を比較検討すると、C型 2 ± 1% に比し、F型は 8 ± 2% と明らかに F型に抑制効果が認められた (p < 0.05)。

2) 肺結核患者血清硫酸分画の抑制効果の検討

次に血清のいかなる分画に抑制効果が存在するかを検討するために、F型患者血清を硫酸塩析法で Fr-E、Fr-P、Fr-A の3分画に分けた。硫酸塩析に用いた血清は Table

Table 1. Clinical Characteristics and % Inhibition of E-Rosette Formation by the Serum from Patients with Pulmonary Tuberculosis

No. of patients	Age	Sex	GAKKEN classification*	% I.R.F.**
T 1	67	Female	F	13
T 2	79	Female	F	4
T 3	48	Female	F	11
T 4	62	Female	F	3
T 5	66	Female	F	10
T 6	51	Female	F	2
T 7	80	Male	F	15
T 8	40	Male	C	0
T 9	21	Male	C	0
T 10	79	Male	C	11
T 11	24	Male	C	0
T 12	54	Female	C	1
T 13	77	Female	C	1
T 14	31	Male	C	0

* F: F type, C: C type

** % I.R.F.: % inhibition on E-rosette formation.

Table 2. Inhibitory Effect of the Serum from Pulmonary Tuberculosis Patients on E-Rosette Formation of Normal T-Cells

GAKKEN classification	No. of patients	% I.R.F.
C.	7	2±1
F.	7	8±2
C.+F.	14	5±1

Table 3. Inhibitory Effect of the Ammonium Saturated Fractions from Serum of F Type Patient on E-Rosette Formation of Normal T-Cell

Salt fraction	No.*	% I.R.F.
Euglobulin Fr.	3	0
Pseudoglobulin Fr.	3	5±1
Albumin Fr.	3	8±3

* In this column, No. shows the number of healthy subjects obtained T-cells.

1 に示したごとく, % I.R.F. が 15% ともつとも高い抑制率を示した T7 血清を使用した。各硫酸分画の % I.R.F. をみると, Table 3 に示したごとく, Fr-E 0% に比し, Fr-P, Fr-A はそれぞれ 5±1%, 8±3% と有意の抑制効果を示した ($p < 0.01$)。しかしながら Fr-P, Fr-A の間には有意の差は認められなかった。

考 案

今回の実験結果は重症肺結核症の血清は健常者 T 細胞の E-rosette 形成を抑制する作用を有し, その抑制物質 (E-rosette inhibition factor, 以下 E.R.I.F. と略す) はプソイドグロブリンおよびアルブミン分画 (非 γ -グロブリン分画) に存在する可能性を示唆した。

患者血清中の抑制物質を検討するにあたって, その抑制を左右する可能性のある 2~3 の宿主側因子がある。第 1 は加齢の因子であり, 加齢とともに免疫機能が低下することはよく知られた事実である²³⁾。今回の我々の研究において, F 型血清, C 型血清における平均年齢はそれぞれ 64.7 歳, 46.5 歳で, 対照血清の年齢は 27 歳であった。抑制の認められた F 型に高齢者が多く認められたが, この点に関して今後更に検討する必要があると思われる。第 2 に低栄養状態における免疫機能の低下の報告もあり²⁴⁾²⁵⁾, 当然血清の抑制効果にも何らかの影響があるものと推測される。しかしながら今回の対象症例には低栄養状態を思わせる症例はなく, 血清蛋白量, 血清アルブミン値も全例正常範囲内にあつた。第 3 に抗結核薬, 特に RFP の影響である。RFP は免疫抑制作用を有する薬剤であるが, 過去 3 カ月以内に RFP を服用した患者は対象より除外したので, RFP の影響はないものと考えられる。

次に E.R.I.F. の検出状況と他の臨床免疫学的所見, つまり患者のツベルクリン反応, 血清 γ -グロブリン量, リンパ球数などの関係を検討したが, 直接の関連性は認められなかった。

血清中の E-rosette 形成抑制物質として従来報告されているものに C-reactive protein²⁶⁾²⁷⁾ (CRP), normal immunosuppressive protein²⁸⁾²⁹⁾ (NIP), immunoregulatory α -globulin^{30)~32)} (IRA) などがある。これらの物質と我々の E.R.I.F. との異同を比較検討してみた。CRP は易熱性で, おもに γ -グロブリン分画に泳動される物質である。我々が使用した血清は 56°C, 30 分間で熱処理してあること, 非 γ -グロブリン分画に抑制が認められること, ならびに使用した患者血清中に CRP 陽性を示した症例がなかったことから, 今回報告した E.R.I.F. が CRP である可能性はない。NIP, IRA はいずれも, 1) 非 γ -グロブリン分画に存在し, 2) 56°C, 30 分間で安定で, 3) 非透析性の物質である。E.R.I.F. と NIP, IRA は上記の 3 点では共通性を有しているが, 今後更に検討していきたい。

すでに, 我々はサ症患者血清は, ①健常者 T 細胞の E-rosette 形成を抑制すること, ②その抑制物質は血清 IgG であること, ならびに ③その抑制機序は IgG が細胞膜に付着することによること, などを報告してきた¹³⁾¹⁴⁾。

サ症血清の抑制率は $20 \pm 4\%$ で肺結核症F型血清 $8 \pm 2\%$ に比して非常に高い抑制率を示す。サ症と肺結核症は病理学的には肉芽腫形成疾患であり、臨床的にも immunodisclepancy を示す症例があるなどの類似点を有するが、血清中の E-rosette 抑制因子が全く異なつた分画(肺結核症は非 γ -グロブリン分画, サ症は γ -グロブリン分画)に認められたことは興味ある事実と思われる。

以上我々は肺結核症血清の非 γ -グロブリン分画に抑制物質が存在する可能性のあることを報告した。今回の検討は、その抑制因子を硫酸分画について検討したにすぎず、今後症例を重ねると共に、更に抑制物質の分離、精製を進めていきたい。

結 語

熊本大学第1内科および国立療養所熊本南病院に入院した肺結核症14例について、患者血清の健常者T細胞の E-rosette 形成に対する抑制効果について検討した。

その結果以下の成績を得た。

1) 一部の肺結核症血清はT細胞の E-rosette 形成を抑制した。その抑制率が10%以上示したものは14例中5例であり、学研分類上F型血清7例中4例, C型血清7例中1例であつた。抑制率の平均値はF型血清 $8 \pm 2\%$, C型血清 $2 \pm 1\%$ でF型血清はC型血清に比し抑制効果が認められた。

2) 患者血清の抑制因子を明らかにするために、高度の抑制率を示したF型患者血清を硫酸塩析法により、オイグロブリン, プソイドグロブリン, アルブミン分画に分離した。その結果、プソイドグロブリン, アルブミン(非 γ -グロブリン)分画に抑制効果が認められた。

本論文の要旨は第54回日本結核病学会総会で報告した。

文 献

- 1) Kent, D.C. and Schwartz, R.: Am. Rev. Respir. Dis., 95 : 411, 1967.
- 2) Holden, M. et al.: N. Engl. J. Med., 285 : 1506, 1971.

- 3) Howard, W.L. et al.: Chest, 57 : 530, 1970.
- 4) Malaviya, A.M. et al.: Am. Rev. Respir. Dis., 112 : 49, 1975.
- 5) McMurray, N.D. et al.: Am. Rev. Respir. Dis., 118 : 827, 1978.
- 6) 藤井昌史他: 結核, 54 : 281, 1979.
- 7) 志摩清: 結核, 48 : 521, 1973.
- 8) 三上理一郎他: 結核, 54 : 110, 1979.
- 9) Bhatnagar, R. et al.: Am. Rev. Respir. Dis., 115 : 207, 1977.
- 10) 志摩清他: 日胸, 17 : 78, 1979.
- 11) Daniel, R.P. et al.: Ann. New York Acad. Sci., 278 : 88, 1976.
- 12) Mangi, R. J.: Clin. Exp. Immunol., 18(4) : 519, 1974.
- 13) 池田俊他: 結核, 51 : 363, 1976.
- 14) Shima, K. et al.: Influence of sarcoid sera on normal T lymphocytes. Proceeding of International conference of sarcoidosis and other granulomatous disease. p. 35 Sep. 11~15th at Cardiff, Wales, UK, 1978.
- 15) Mittal, K.K. et al.: Nature (London), 225 : 1255, 1970.
- 16) Winchester, R.J. et al.: J. Clin. Invest., 54 : 1082, 1974.
- 17) Trubowitz, S. et al.: Cancer, 19 : 2019, 1966.
- 18) Field, E.J. and Caspary, E. A.: Br. J. Cancer, 26 : 164, 1972.
- 19) Levene, G. M. et al.: Lancet, ii: 246, 1969.
- 20) Canales, J. et al.: Lancet, ii: 567, 1969.
- 21) Böyum, A.: Scand. J. Chem. Lab. Invest. (Suppl.), 21(97) : 77, 1968.
- 22) Weiner, M.S.: Blood, 42 : 939, 1973.
- 23) Jouanen, E.O. et al.: Am. J. Med., 58 : 620, 1975.
- 24) Walker, A.M.: Cell. Immunol., 15 : 372, 1975.
- 25) Weinberg, E.D.: JAMA, 231 : 39, 1975.
- 26) Oishi, N. et al.: J. Reticulo. Endoth. Soc., 14 : 242, 1973.
- 27) Mortensen, R.F. et al.: J. Exp. Med., 141 : 821, 1975.
- 28) Havemann, K. et al.: Z. Gesamte. Exp. Med., 153 : 297, 1970.
- 29) Nelken, D.: J. Immunol., 110 : 1161, 1973.
- 30) Mannik, J.A.: Transplantation, 5 : 1231, 1967.
- 31) Cooperband, S.R.: J. Immunol., 109 : 154, 1972.
- 32) Meuzoian, J.O. et al.: J. Immunol., 113, 266, 1974.