

原 著

フローサイトメトリーによる PPD 活性化リンパ球の解析

原 田 泰 子 ・ 石 橋 凡 雄 ・ 原 田 進
高 本 正 祇 ・ 篠 田 厚国立療養所大牟田病院
受付 昭和 63 年 8 月 4 日FLOWCYTOMETRIC ANALYSIS OF LYMPHOCYTES
PROLIFERATED *IN VITRO* BY PPDYasuko HARADA *, Tsuneo ISHIBASHI, Susumu HARADA,
Masahiro TAKAMOTO and Atushi SHINODA

(Received for publication August 4, 1988)

The present study was undertaken to do phenotype determination of *in vitro* proliferating lymphocytes by PPD stimulation using combination of monoclonal antibodies and flow-cytometry.

The results obtained were as follows :

1) PPD induced a significant proliferation of activated T cell subsets ($\text{Leu4}^+\text{DR}^+$ cells, $\text{IL2-R}^+\text{Leu3}^+$ cells).

2) PPD also induced a significant increase in Pan T cells (Leu4^+) and helper T cells ($\text{Leu3}^+\text{8}^-$).

Taken together, these results indicate that PPD induced proliferating lymphocytes belong predominantly to helper T cell subset.

3) The numbers of inducer T cells ($\text{Leu3}^+\text{8}^+$), suppressor T cells ($\text{Leu2}^+\text{15}^+$) and cytotoxic T cells ($\text{Leu2}^+\text{15}^-$) were not influenced by PPD-stimulation.

4) However, PPD induced a smaller, but significant proliferation of $\text{IL2-R}^+\text{Leu2}^+$ cells.

5) The number of B cells ($\text{Leu4}^-\text{DR}^+$) tended to increase slightly after PPD-stimulation.

Key words : Flowcytometry, Monoclonal antibody, Lymphocyte subsets, PPD-induced lymphocyte proliferation

キーワードズ : フローサイトメトリー, モノクローナル抗体, リンパ球サブセット, PPD 惹起リンパ球増殖

はじめに

1960年に Nowell は, phytohemagglutinin (PHA) により, リンパ球が増殖することを報告した¹⁾。それ以来, 免疫感作された個体のリンパ球は, その感作抗原に

より *in vitro* で増殖することがよく知られている。Pearmain²⁾ により結核患者や, ツベルクリン陽性正常者のリンパ球が, ツベルクリンによりブラスト化 (blast transformation) することが示されて後, ツベルクリンによる *in vitro* のリンパ球増殖反応は, ツベルクリン

* From the National Ohmuta Hospital, Tachibana 1044-1, Ohmuta, Fukuoka 837 Japan.

ン皮膚反応（ツ反）で示される遅延型過敏症とよく相関すると考えられている^{3)~7)}。

この抗原惹起 lymphocyte proliferation は、方法論としては形態学的観察法、autoradiography 法から現在は³H-thymidine の取り込みの定量法と発展してきた。一方、リンパ球はモノクローナル抗体とフローサイトメトリーにより種々のサブセットが高い精度で測定できるようになった。本文では、ツ反強陽性健常者より得たリンパ球を用い、Purified protein derivative-tuberculin (PPD) 刺激による増殖リンパ球のサブセット解析を試みたので報告する。

対象と方法

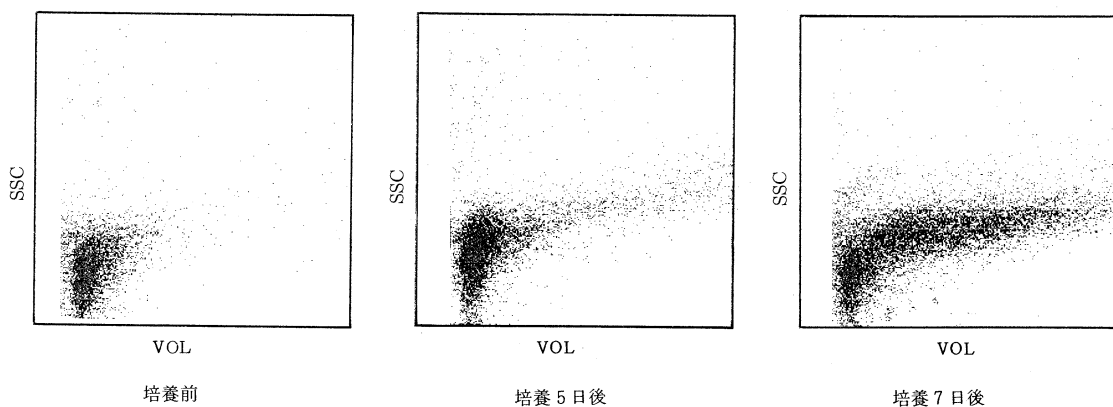
対象：当院職員8名（男性6名，女性2名）であり年齢は53~27歳（平均39歳）である。対象者はすべて胸部レ線，末梢血検査，血液生化学により正常であり，ツ反は48時間硬結15mm以上の強陽性である。採血は午前8時から10時までに行った。

培養方法とリンパ球サブセットの測定：被検者の静脈血10mlをヘパリン加採血し，Leuco-PREP (Becton Dickinson Co. #92-0008)を用い，室温にて900g 10分間の遠心分離により，単核細胞層を採取した。次にこの単核細胞層を0.15M pH7.2のPhosphate buffered saline 30mlにより，4℃にて300gで10分間，および400gで10分間の2回の遠心操作を繰り返して洗浄した。最後にEagle's Minimum Essential Medium (GIBCO L. #320-1090)にて300g 10分間1回の遠心操作により洗浄後，リンパ球数を $1.0 \times 10^6 / \text{ml}$ に調整して培養液に浮遊させた。培養液はRPMI 1640 (25mM HEPES Buffer, L-glutamin 加) (GIBCO L. #380-2400)に，プールした非働化人AB血清を20%，L-glutamin $40 \mu\text{M}/\text{ml}$ ，Penicillin 100 U/ml，

Streptomycin $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように添加して作成した。培養は細胞浮遊液1mlをプラスチック丸底チューブ (Falcon L. #2001) に入れ，CO₂ インキュベーター内で37℃加湿，5% CO₂ 含有大気下に静置して行った。抗原刺激には人型結核菌青山B株より精製されたPPD抗原CIP (日本ビーシージー)を用い，dose response および time course の予備実験結果 (データ省略) から，濃度は $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ とし，抗原添加は培養開始時に行った。7日間培養後，培養液中のリンパ球数を白血球計算盤にて算定した後，前報⁸⁾に従ってモノクローナル抗体による二重染色法によりFACS-analyzer (Becton Dickinson 社)を用いてリンパ球サブセットを測定した。有意差の検定はStudentのt-testにより行った。

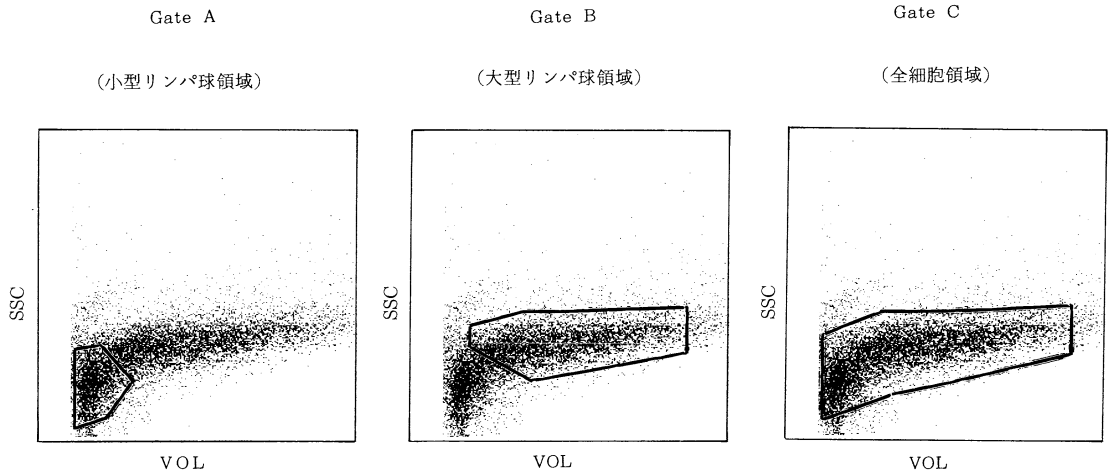
モノクローナル抗体：前報と同じくLeuシリーズ (Becton Dickinson 社) のLeu 4, Leu 2a, Leu 2A, Leu 3a, Leu 8, Leu 15, と抗IL2 receptor (IL2-R), Ortho 社のOKDRを用いた。Fluorescein isocyanate 標識とPhycoerythrin 標識の抗体を組み合わせ，二重染色により解析した。

培養時間とサイトグラムの検討：予備実験として培養時間を3日，5日，7日として検討した結果のサイトグラムを図1に示した。横軸が細胞のvolumeを示すが，培養前の小リンパ球集団が，培養5日，7日としいに大型化することがわかる。この結果，培養期間は7日とした。この7日培養のサイトグラム上，小型リンパ球領域 (Gate A)，大型リンパ球領域 (Gate B) および全細胞領域 (Gate C) に図2に示すようにゲートをかけて，各領域の活性化Tリンパ球を主とするリンパ球サブセットを測定し，表1に示した。大型リンパ球領域 (Gate B) に，Leu 4⁺DR⁺ やIL2-R⁺ の活性化T細胞が著明に増加していることがわかる。さらに，培養前



横軸は細胞の大きさを表し，縦軸は細胞の内部構造の複雑さを表す。

図1 培養リンパ球のサイトグラム



横軸は細胞の大きさを、縦軸は細胞の内部構造の複雑さを表す。

図2 PPD刺激7日後のサイトグラム上に設定したゲート

表1 ゲート別による、リンパ球サブセット (特に活性化リンパ球) の変化

	GATE		
	A	B	C
Leu 4	81.6%	87.2%	81.4%
OKDR	11.0	49.4	34.3
Leu 4 ⁺ DR ⁺ (Activated T cells)	3.9	40.0	25.3
Leu 3	47.9	70.2	60.8
Leu 2	30.6	12.5	17.1
Leu 3 ⁺ Leu 8 ⁻ (Helper T cells)	20.6	63.2	49.4
IL 2 receptor ⁺	16.6	74.1	52.5
IL 2-R ⁺ Leu 3 ⁺ (Activated T cells)	10.9	63.1	43.2

と PPD 下培養 7 日後の Leu 4, OKDR 抗体による二重染色の two color analysis の像を図 3 に示した。PPD 刺激により Leu 4⁺DR⁺ の活性化リンパ球の増加が明らかである。これらの結果より、以後、ゲートは前細胞領域 (Gate C) にかけて測定を行った。

成 績

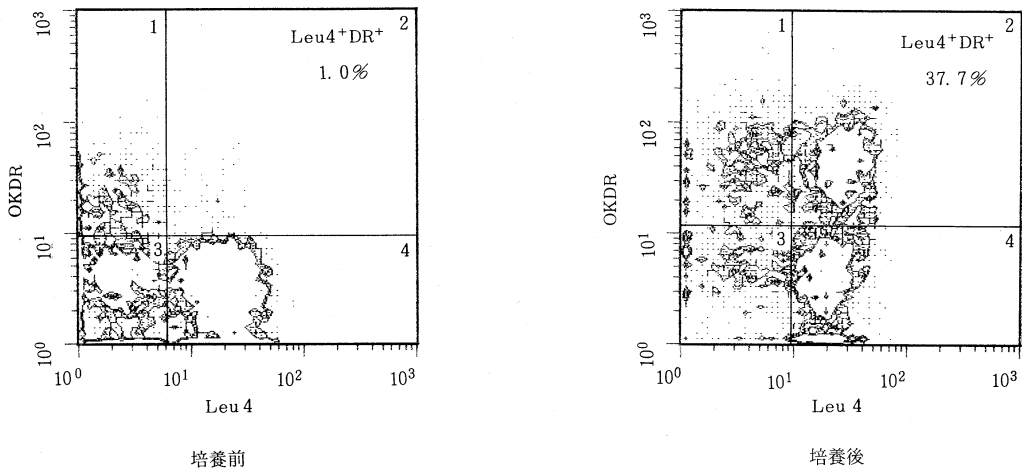
培養前のリンパ球について検討した各種サブセット値について表 2 に示した。活性化リンパ球のフェノタイプとして Leu 4⁺DR⁺ 細胞, IL-2R⁺ 細胞を見ると、それぞれ 1%前後は存在している。

培養 7 日後の各サブセットの比率を表 3 に示した。まず PPD 無添加の対照培養の各サブセットの比率は、培

養前のそれと大差がない。しかし活性化 T 細胞である Leu 4⁺DR⁺ 細胞は培養前 1.5±0.8%が培養後 3.8±1.9%に、IL2-R 陽性細胞は培養前 1.2±0.9%が、培養後 5.0±1.2%と若干増加している。いわゆる spontaneous blastogenesis が僅少なながらも認められた。PPD 無添加対照培養と、PPD 刺激下培養を比較すると、表 3 のごとく、Leu 3⁺8⁻ の helper T 細胞、および活性化 T 細胞のサブセット (Leu 4⁺DR⁺ 細胞, IL 2-R⁺ 細胞, IL 2-R⁺Leu 3⁺ 細胞, IL 2-R⁺Leu 2⁺ 細胞) が PPD 刺激により有意に増加していた。一方 Leu 3⁺8⁺ の inducer T 細胞, Leu 2⁺15⁻ の cytotoxic T 細胞の比率は、PPD 刺激により有意の低下を示した。

次いで、培養後の細胞数を単位培養液 (mm³) 中の実数で表 4 に示した。対照培養に対して PPD 刺激培養では、リンパ球総数, Pan T 細胞 (Leu 4⁺), helper T 細胞 (Leu 3⁺8⁻), 活性化 T 細胞 (Leu 4⁺DR⁺ 細胞, IL 2-R⁺ 細胞, IL 2-R⁺Leu 3⁺ 細胞, IL 2-R⁺Leu 2⁺ 細胞) が有意の増加を示した。

PPD 刺激下培養の各サブセットの細胞数と対照培養の細胞数の比を、仮に Lymphocyte proliferation ratio として見た。その結果は表 4 のごとく、活性化 T 細胞のフェノタイプを示す細胞はすべて 10 倍以上の顕著な増加を示した。またリンパ球総数, Pan T 細胞 (Leu 4⁺), helper T 細胞 (Leu 3⁺8⁻) は 2 倍以上の有意な増加を示している。一方 inducer T 細胞 (Leu 3⁺8⁺), suppressor T 細胞 (Leu 2⁺15⁺), cytotoxic T 細胞 (Leu 2⁺15⁻) は、PPD 刺激によってほとんど増加していない。B 細胞 (Leu 4⁻DR⁺) は増加の傾向を示すが有意差はない。



横軸は Leu4 陽性細胞を、縦軸は OKDR 陽性細胞を表す。
 1: Leu4⁻ DR⁺細胞 (B細胞) 2: Leu4⁺ DR⁺ (DR 陽性 T 細胞: Activated T 細胞)
 3: Leu4⁻ DR⁻細胞 4: Leu4⁺ DR⁻細胞

図3 培養前後における DR 陽性 T 細胞の変化

Two color flowcytometric analysis (Leu 4, OKDR : FACSAnalyzer-consort30)

表2 培養前リンパ球のサブセット値

	Lymphocyte	Leu 4 ⁺	Leu 3 ⁺ 8 ⁻	Leu 3 ⁺ 8 ⁺	Leu 2 ⁺ 15 ⁺	Leu 2 ⁺ 15 ⁻
絶対数 (/mm ³)	2130 ± 1060	1510 ± 800	490 ± 260	470 ± 330	67 ± 53	520 ± 300
パーセント		66.6 ± 8.9	23.0 ± 6.2	20.2 ± 5.7	3.3 ± 2.8	21.1 ± 7.1

	Leu 4 ⁺ DR ⁺	Leu 4 ⁻ DR ⁺	IL2-R ⁺	IL2-R ⁺ Leu3 ⁺	IL2-R ⁺ Leu2 ⁺
絶対数 (/mm ³)	38 ± 28	200 ± 170	24 ± 15	18 ± 9	4 ± 5
パーセント	1.5 ± 0.8	8.7 ± 5.3	1.2 ± 0.9	0.9 ± 0.4	0.2 ± 0.3

考 案

結核症において、結核菌に対する抵抗性は細胞性免疫により発現することはよく知られている⁹⁾¹⁰⁾。また細胞性免疫はツベルクリン皮膚反応が示す遅延型過敏症と平行して発現し、T細胞により起こるとされている¹¹⁾¹²⁾。*in vitro*の PPD 惹起リンパ球増殖反応が、*in vivo*のツベルクリン皮膚反応の程度とよく相関することは、諸家により認められている^{3)~7)}。また PPD による増殖リンパ球は T細胞であり¹³⁾そのサブセットが helper/inducer T細胞であることも示されている^{14)~16)}。現在 *in vitro*における抗原や mitogen による lymphocyte proliferation (lymphoblast transformation) は、³H-thymidine の取り込みを測る定量法が確立されて

いる。

近年フローサイトメトリーが開発され、モノクローナル抗体によるリンパ球の膜表面抗原が正確に測定されるので、PPD による増殖リンパ球のフェノタイプの変化を測定した。この測定法では、リンパ球の分裂増殖の直接のマーカーを見るわけではない。しかし、分裂増殖の一過程また結果である活性化リンパ球 IL2-R⁺細胞¹⁷⁾、DR⁺T細胞¹⁸⁾を正確に算定できると考えられる。

PPD 無添加の対照培養の活性化リンパ球 (Leu 4⁺ DR⁺細胞、IL2-R⁺細胞)を見ると、各々 3.8 ± 1.9%、5.0 ± 1.2%と若干の spontaneous blastogenesis が認められる。この値は、ごく初期の Blast transformation の報告とほぼ一致する¹⁹⁾²⁰⁾。表3、4のごとく、活性化 T細胞である Leu 4⁺ DR⁺細胞、IL2-R⁺細胞

表3 培養リンパ球のサブセット比率の変化(%)

	Leu 4 ⁺	Leu 3 ⁺ 8 ⁻	Leu 3 ⁺ 8 ⁺	Leu 2 ⁺ 15 ⁺	Leu 2 ⁺ 15 ⁻
培養前	66.6 ± 8.9	23.0 ± 6.2	20.2 ± 5.7	3.3 ± 2.8	21.1 ± 7.1
培養後 PPD(-)	69.2 ± 6.1	25.4 ± 7.9	23.3 ± 8.2	1.9 ± 1.3	19.4 ± 3.9
培養後 PPD(+)	75.4 ± 5.7	51.5 ± 12.1 ^{***}	11.3 ± 7.1 ^{**}	1.8 ± 1.1	13.0 ± 4.8 [*]

	Leu 4 ⁺ DR ⁺	Leu 4 ⁻ DR ⁺	IL2-R ⁺	IL2-R ⁺ Leu 3 ⁺	IL2-R ⁺ Leu 2 ⁺
培養前	1.5 ± 0.8	8.7 ± 5.3	1.2 ± 0.9	0.9 ± 0.4	0.2 ± 0.3
培養後 PPD(-)	3.8 ± 1.9	6.6 ± 2.1	5.0 ± 1.2	2.7 ± 0.5	1.7 ± 1.1
培養後 PPD(+)	25.4 ± 13.6 ^{***}	7.6 ± 2.5	49.1 ± 15.5 ^{***}	41.1 ± 17.3 ^{***}	4.2 ± 3.2

*: P<0.02 **: P<0.01 ***: P<0.005

表4 培養リンパ球のサブセット絶対数の変化(絶対数/mm³)

	Lymphocyte	Leu 4 ⁺	Leu 3 ⁺ 8 ⁻	Leu 3 ⁺ 8 ⁺	Leu 2 ⁺ 15 ⁺	Leu 2 ⁺ 15 ⁻
PPD (-)	450 ± 100 ^{**}	320 ± 93 ^{***}	120 ± 40 ^{***}	110 ± 52	9 ± 7	84 ± 25
PPD (+)	990 ± 310	760 ± 300	510 ± 200	120 ± 130	17 ± 9	110 ± 44
L.P. Ratio	2.1 ± 0.7	2.4 ± 0.6	5.0 ± 2.7	1.0 ± 0.5	2.5 ± 1.9	1.5 ± 0.7

	Leu 4 ⁺ DR ⁺	Leu 4 ⁻ DR ⁺	IL2-R ⁺	IL2-R ⁺ Leu 3 ⁺	IL2-R ⁺ Leu 2 ⁺
PPD (-)	18 ± 12 [*]	29 ± 20	23 ± 6 ^{***}	11 ± 4 ^{***}	4 ± 2 ^{**}
PPD (+)	280 ± 280	180 ± 210	510 ± 280	430 ± 290	38 ± 30
L.P. Ratio	15.7 ± 6.2	2.8 ± 1.5	25.6 ± 16.2	35.9 ± 20.1	11.4 ± 8.7

L.P. Ratio : Lymphocyte Proliferation Ratio

*: P<0.02 **: P<0.01 ***: P<0.005

を、対照培養と PPD 刺激下培養と比較すると、PPD 刺激により有意に増加している。特に活性化リンパ球の絶対数の PPD 刺激による増加率 (Lymphocyte proliferation ratio) は、Leu 4⁺DR⁺ 細胞で 15 倍、IL2-R⁺ 細胞で 25 倍と著明に上昇している。³H-thymidine 取り込みによる定量法と直接の比較試験は行っていないが、Lymphocyte proliferation ratio で見る方法の sensitivity は、³H-thymidine 取り込み法に匹敵するものと考えられる。IL2-R⁺Leu 3⁺ 細胞の増加率はさらに高い。この結果と Leu 3⁺8⁻ 細胞の増加を合わせ考えると、PPD 刺激によるリンパ球増殖反応の主たる細胞は helper T 細胞であると考えられる。その他の T 細胞サブセットである inducer T 細胞 (Leu 3⁺8⁺)、suppressor T 細胞 (Leu 2⁺15⁺)、cytotoxic T 細胞 (Leu 2⁺15⁻) は、PPD 刺激によってほとんど変化を示さな

かった。しかし IL2-R⁺Leu 2⁺ 細胞が低値ながらも有意の増加を示している。このことは、今回の培養条件 (抗原量、培養日数) を変えることによって、免疫反応の down regulation に関与する suppressor/cytotoxic T 細胞系の活性化の可能性を示唆するものと考えられる。さらに検討を続けたい。

現在、種々のリンパ球膜表面抗原に対するモノクローナル抗体が開発されている状況から見て、抗原惹起増殖リンパ球のフローサイトメトリーによる解析は、免疫反応機構の詳細をさらに解明する有力な手段となると考えられる。

ま と め

ツベルクリン強陽性健康者の末梢血リンパ球を用い、*in vitro* で PPD 惹起リンパ球増殖反応を行い、増殖リ

ンパ球のフェノタイプをフローサイトメトリーにより解析した。

1) PPD 刺激により活性化 T 細胞 (Leu 4⁺ DR⁺ 細胞, IL 2-R⁺ Leu 3⁺ 細胞) は著明な増加を示した。

2) Pan T 細胞 (Leu 4⁺), helper T 細胞 (Leu 3⁺ 8⁺) も有意に増加した。上記の結果より PPD 刺激により増殖する主たる細胞は helper T 細胞に属するものと考えられる。

3) inducer T 細胞 (Leu 3⁺ 8⁺), suppressor T 細胞 (Leu 2⁺ 15⁺), cytotoxic T 細胞 (Leu 2⁺ 15⁻) は, PPD 刺激による増加を示さなかった。

4) しかし PPD 刺激により IL 2-R⁺ Leu 2 細胞は, 少量ながら有意の増加を示した。

5) B 細胞 (Leu 4⁻ DR⁺) は, PPD 刺激により増加の傾向にあった。

文 献

- 1) Nowell, P. C. : Phytohemagglutinin : An inhibitor of mitosis in cultures of normal human leukocytes, *Cancer Res*, 20 : 462-467, 1960.
- 2) Pearmain, G. et al. : Tuberculin-induced mitosis in peripheral blood leucocytes, *Lancet*, 1 : 637-638, 1963.
- 3) McFarland, W. et al. : Comparison of lymphocyte transformation and intradermal reactions to tuberculins, *Am Rev Respir Dis*, 93 : 742-748, 1966.
- 4) Gump, D. W. et al. : Studies of human leukocyte culture as in vitro test of delayed hypersensitivity, *Am Rev Respir Dis*, 95 : 470-476, 1967.
- 5) Kerby, G. R. : Correlation of tuberculin skin reaction with *in vitro* lymphocyte transformation, *Am Rev Respir Dis*, 97 : 904-908, 1968.
- 6) Hinz Jr, C. F. et al. : Quantitative aspects of the stimulation of lymphocytes by tuberculin purified protein derivative, *Int Arch Allergy*, 38 : 119-129, 1970.
- 7) McMurray, D. N. et al. : Cell-mediated immunity in anergic patients with pulmonary tuberculosis, *Am Rev Respir Dis*, 118 : 827-834, 1978.
- 8) 石橋凡雄他 : リンパ球サブセットの正常値及び加齢に伴う変動, *結核*, 62 : 647-654, 1987.
- 9) Edwards, D et al. : The immunology of mycobacterial diseases, *Am Rev Respir Dis*, 134 : 1062-1071, 1986.
- 10) Mackaness, G. B. : The influence of immunologically committed lymphoid cells of macrophage activity *in vivo*, *J Exp Med*, 129 : 973-992, 1969.
- 11) North, R. J. : Importance of thymus-derived lymphocytes in cell-mediated immunity to infection, *Cell Immunol*, 7 : 166-176, 1973.
- 12) Lefford, M. J. : Transfer of adoptive immunity to tuberculosis in mice, *Infect Immun*, 11 : 1174-1181, 1975.
- 13) Chess, L. et al. : Immunologic functions of isolated human lymphocyte subpopulations, II. Antigen triggering of T and B cells *in vitro*, *J Immunol*, 113 : 1122-1127, 1974.
- 14) Okubo, Y. et al. : PPD-specific proliferative response in humans. I. Analysis of PPD-specific proliferative cells from tuberculous pleurisy patients and healthy controls with monoclonal antibodies specific for human T subsets, *Microbiol Immunol*, 26 : 511-521, 1982.
- 15) Bach, M. A. et al. : *In vitro* proliferative response to M. leprae and PPD of isolated T cell subsets from leprosy patients, *Clin Exp Immunol*, 52 : 107-114, 1983.
- 16) Shiratsuchi, H. et al. : Analysis of T cell subsets by monoclonal antibodies in patients with tuberculosis after *in vitro* stimulation with purified protein derivative of tuberculin, *Clin Exp Immunol*, 57 : 271-278, 1984.
- 17) Cantrell, D. A. et al. : The interleukin-2 T cell system : A new cell growth model, *Science*, 224 : 1312-1316, 1984.
- 18) Cotner, T. et al. : Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation antigen expression and DNA content, *J Exp Med*, 157 : 461-472, 1983.
- 19) Oppenheim, J. J. et al. : Cellular localization of carbon-14 endotoxin in cultured leucocytes, *Nature*, 211 : 767-768, 1966.
- 20) Yam, L. T. et al. : Quantitative evaluation of phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures, *J Lab & Clin Med*, 70 : 699-706, 1967.