

今村賞受賞記念講演

ヒトの結核免疫に関する細胞生物学的研究

露 口 泉 夫

大阪府立羽曳野病院

受付 昭和 55 年 5 月 26 日

Commemorative Lecture of Receiving Imamura Memorial Prize

IMMUNOLOGICAL STUDY ON HUMAN TUBERCULOSIS AT
THE CELLULAR LEVEL

Izuo TSUYUGUCHI*

(Received for publication May 26, 1980)

It was found that there were two different subsets of thymus derived T lymphocytes when lymphocytes from patients with tuberculosis were stimulated *in vitro* with tuberculin purified protein derivative, PPD. The one was IgG Fc-receptor bearing T cells (T_G) and the other was rosette forming T cells with autologous erythrocytes. Both of which are supposed to play an important role not only in the induction of tuberculin hypersensitivity but also in immunity to tuberculosis.

- 1) Increase in IgG Fc-receptor bearing T cells (T_G) in PBL of tuberculous patients by the *in vitro* stimulation with PPD

A mixed rosette technique with sheep erythrocytes and chicken erythrocytes coated with heat-aggregated human IgG was employed to identify human peripheral blood T lymphocytes bearing IgG Fc-receptor (T_G). When peripheral blood lymphocytes (PBL) from patients with advanced, refractory tuberculosis were stimulated *in vitro* with PPD, increase in the number of T_G cells was observed, whereas no such T_G cells were developed in PBL from newly diagnosed tuberculous patients after the stimulation with PPD. T_G cells isolated from the tuberculin skin test positive individual by the method of velocity sedimentation suppressed PPD-induced proliferative response of autologous PBL, as well as the pokeweed mitogen-induced IgG synthesis by B cells.

- 2) PPD-stimulated development in tuberculosis of T cells bearing receptors for autologous erythrocytes

Tuberculous human lymphocytes activated *in vitro* with tuberculin PPD were examined for rosette formation with autologous erythrocytes. The autorosette forming cell (auto-RFC) levels were strongly enhanced when pleural fluid lymphocytes and, to a lesser extent, PBL of the patients with tuberculosis were stimulated *in vitro* with PPD, whereas no increase in auto-RFC was observed in PBL from tuberculin skin test negative healthy individuals. These auto-RFC developed were shown to rosette with sheep erythrocytes and, therefore, belong to a T cell subset. It was also shown that adherent cells were required for the development of auto-RFC by the stimulation with PPD. Depletion of PPD-stimulated auto-RFC by the velocity sedimentation technique led to a significant decrease in PPD reactivity assessed by the proliferation or auto-RFC formation.

* From the Osaka Prefectural Habikino Hospital, Habikino-shi, Osaka 583 Japan.

ツベルクリン遅延型反応に代表される結核、特にヒトの結核症における細胞性免疫に関する細胞レベルでの解析は、いまだ充分にはなされていない。著者は、モルモットを実験動物として、ツベルクリン皮内反応が胸腺由来の、いわゆるTリンパ球により正常動物に受身伝達が可能なこと²¹、骨髄由来のBリンパ球はその際、抑制的に作用することを報告してきた²²。また、Tリンパ球による抗原認識において、マクロファージ-Tリンパ球間には2つのシグナル、すなわち、おそらくIa-抗原と複合体を形成した形での抗原決定基と、もう一つはマクロファージと、おそらくはBリンパ球からも産生されると考えられる可溶性因子との、2つのシグナルが共存して、はじめてTリンパ球の活性化がみられることをすでに報告した²³。

一方、最近の免疫学の流れは、ヒトにおける種々の免疫反応の解析にむけられ、急速な展開がなされつつある。著者はそこで、実際の結核患者について免疫学的な解析を試みた。その結果、結核患者末梢リンパ球中には、ツベルクリン PPD に反応性の2種類のTリンパ球が存在すること、すなわち、一つは免疫グロブリンGのFcにむけられた受容体をもち、反応に抑制的に作用するTリンパ球(T_γ)であり、いま一つはPPD刺激により、自己赤血球とロゼットを形成する細胞で、PPDに反応性のeffector-Tリンパ球に属すると考えられる細胞である。そして、これら2種類のTリンパ球が結核症の病態、経過のちがいによつて出現の消長が異なることを示唆する結果を得た。

1) PPD刺激で増加するT_γ細胞⁴⁾

Tリンパ球が、特異的あるいは非特異的な刺激によつて活性化された場合、その表面にIgGのFc部分に対する受容体を顕出してくるといわれる。そこで、結核患者末梢血リンパ球を用い、PPDで刺激した場合、このT_γ細胞の増加と、またその分離を試み、機能についても検討を加えた。

a) T_γ細胞の検出方法

Fc-受容体をもつリンパ球の検出は、市販のヒトガンマグロブリン(HGG)を60°C、40分間加熱処理にてaggregateさせたのち、塩化クロミウム法⁵⁾により、ニワトリ赤血球(CRBC)に結合させたaggr-HGG-CRBCによるロゼット形成で行なつた。したがつて、T_γの検出は、このaggr-HGG-CRBCとSRBCとによる二重ロゼット形成細胞を算定することにより行なつた。そのロゼット形成の特異性は、HGGのパパイン消化によるFc分画により特異的にロゼット形成の抑制がみられることより確かめた。

b) PPD刺激の最適条件

ツベルクリン反応陽性者の末梢血リンパ球(PBL)を

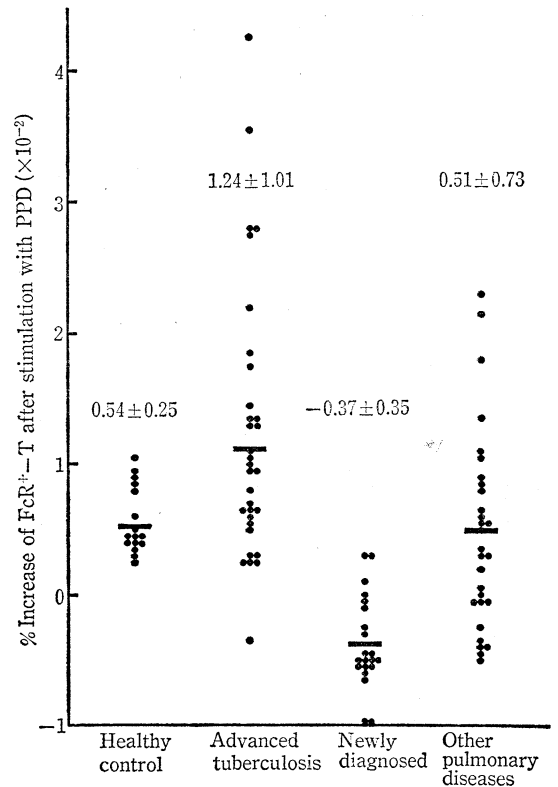


図1 末梢血リンパ球のPPD刺激によるT_γ細胞の増加

PPDで*in vitro*で刺激した場合、PPD濃度10μg/ml 3日間の培養の条件において最も高いT_γ細胞の増加をみた。以下の成績はこの条件で行なつた結果である。

c) 末梢血リンパ球のPPD刺激によるT_γ細胞の検出

図1は、種々の患者より採取したPBLをPPD 10μg/ml、3日間*in vitro*で培養したのち、二重ロゼット形成法でT_γを算定、PPD刺激なしで培養した場合に比べ、その増加を%で示した成績である。ツベルクリン反応陽性の健康人対照群と、結核以外の呼吸器疾患(主に肺気腫および気管支喘息)群との間には差は認めないが、結核のうちで新鮮症例群ではほとんどPPD刺激による特異的な増加を示さないが、難治進展症例群では、他のいずれの群に比べても有意の増加を示した。

d) T_γ細胞の機能について

図2は、PPD刺激によるPBLの分裂幼若化反応の系へ、Ficoll-Hypaque比重遠心法で分離したT_γ細胞を加えた際の成績である。6日間培養し、最終18時間の³H-チミジンの細胞への取り込みで測定した。PPD刺激によるPBLの反応に対してT_γ(FcR⁺-T)は抑制的に作用しているのがわかる。また、平野らの方法⁶⁾によるPokeweed Mitogen刺激によるPBLの非特異的なIgGの産生に対しては、やはりT_γ細胞は抑制的に作用し

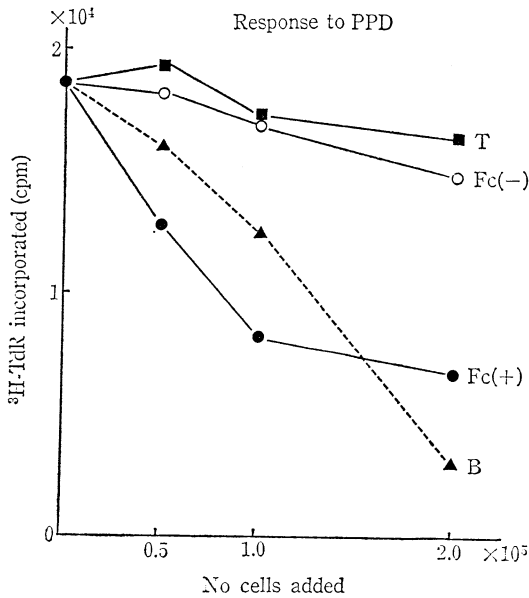


図2 PPD刺激による末梢血リンパ球の分裂幼若化反応に及ぼすT_H細胞(Fc(+))の影響

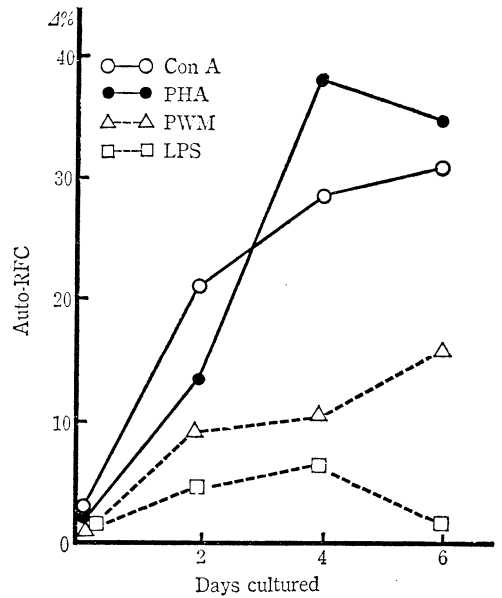


図3 マイトジェン刺激による auto-RFC の増加

た。

2) PPD 刺激により出現する自己赤血球とロゼットを形成するリンパ球 (auto-RFC)

ヒトのリンパ球の一部に、自己の赤血球に親和性を持ち、ロゼットを形成してくる細胞 (auto-RFC) が存在し、主に未成熟な T-リンパ球に属することが報告されている⁷⁾。一方、Fournier らは最近、ヒト末梢リンパ球を Con A で刺激すると、この auto-RFC が増加することを報告している⁸⁾。これらの報告は auto-RFC は、活性化をうけ、幼若化反応を起こしたヒトの Tリンパ球の一つのマーカーになりうることを示唆している。他方、ツベルクリン反応陽性の結核患者の PBL や、胸膜炎胸水リンパ球を、*in vitro* で PPD で刺激すると、強い分裂幼若化反応を起こすことが知られている。そこで著者らは、結核患者からのこれらのリンパ球を PPD で刺激したところ、自己赤血球によるロゼット形成性リンパ球の増加を観察し、いずれも Tリンパ球に属する成績を得た。

a) auto-RFC 形成条件

種々の条件を検討の結果、胎児牛血清 (FCS) 中で、 $5 \times 10^6/ml$ のリンパ球と 2.5% の自己赤血球を等量混合し、37°C、15分インキュベート後、遠心し、2時間水中に静置後算定が最適の条件であつた。顕微鏡下で観察し、少なくとも3個以上の赤血球を結合したリンパ球を auto-RFC と算定した。

b) マイトジェン刺激による auto-RFC の増加

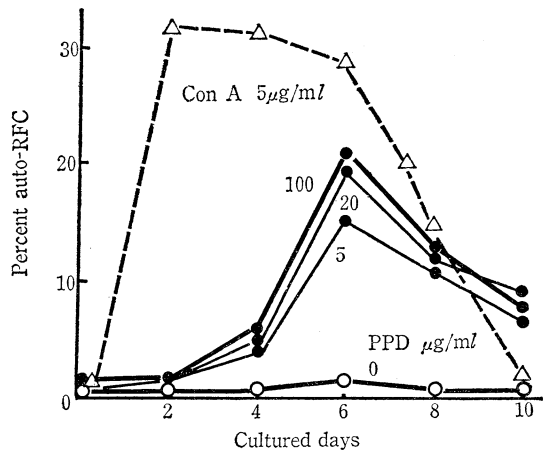


図4 PPD および Con A 刺激による胸水リンパ球中の auto-RFC の増加

健康人 PBL を、幼若化反応を起こすのに最適の濃度の、各種マイトジェン存在下で *in vitro* で培養し、出現してくる auto-RFC を算定した。図3に示すように、Con A, PWM および PHA 刺激によつては、auto-RFC の著明な増加がみられたが、LPS 刺激では有意の増加はみられなかつた。

c) PPD 刺激による auto-RFC の増加

結核性胸膜炎患者の胸水中リンパ球を、種々の濃度の PPD で培養したところ、図4に示すように、6日をピークに auto-RFC の増加をみた。このカーブは、胸水リンパ球の PPD 刺激による分裂幼若化反応のカーブとよく一致した。

表 1 PPD 刺激により出現する Auto-RFC

		Auto-RFC developed ($\Delta\%$)			
PBL, Tuberculin-negative		PBL, Tuberculin-positive		Pleural lymphocytes	
PPD	Con A	PPD	Con A	PPD	Con A
0.6		5.5		17.5	26.4
0.2	64.2	2.6	15.2	32.8	
1.3		4.5		12.7	
—	35.8	8.0		13.7	
0.1		12.4		32.7	24.6
—		5.6		9.3	
0.4		7.0	17.8		
		8.0			
		9.0			
		9.0			
		2.3	40.4		
0.4 \pm 0.2		6.5 \pm 1.0		19.8 \pm 4.2*	

Lymphocytes from peripheral bloods or pleural fluids were cultured *in vitro* for 6 days with PPD (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or 3 days with Con A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and then assayed for auto-RFC. Data were presented as $\Delta\%$ of auto-RFC developed by the stimulation with PPD or Con A.

* Mean \pm SEM

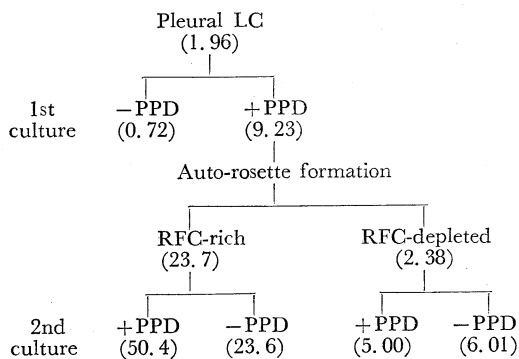


図 5 胸水中の PPD 反応性リンパ球の分離 (カッコ内の数字は auto-RFC の%を示す)

種々の患者の末梢血リンパ球 (PBL) および胸水リンパ球を同様に, PPD 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の存在下で *in vitro* で培養し, 6日後の auto-RFC の形成をみた結果を表 1 に示した。ツベルクリン反応陰性者は, 主に10歳以下の小児であった。陰性者群では PPD 刺激による auto-RFC の増加はほとんどみられなかったが, 非特異的な Con A 刺激によつては, 他のツベルクリン反応陽性者群と同様の高いロゼット形成率を示した。

これらのレクチンおよび PPD 刺激で出現してくる auto-RFC は, いずれも Tリンパ球に属することは, ヒツジ赤血球とによる二重ロゼット形成法で確かめられた。

d) auto-RFC 出現における adherent cell の必要性
ツベルクリン反応陽性の健康人からの PBL を採取し, ヒツジ赤血球による E-ロゼットを形成, 分離後, ナイ

ロン・ウールカラム非附着性の細胞を集め, Tリンパ球を精製した。このようにして得た Tリンパ球分画の95%以上が E-ロゼットを形成した。adherent cell は, 非ロゼット形成性細胞分画をプラスチック・シャーレに付着させ採取した。*in vitro* で Con A (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と3日間, または PPD (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と6日間培養し, ^3H -チミジンの取り込みと auto-RFC の算定を行なつた。その結果, PPD または Con A 刺激による分裂幼若化反応および auto-RFC の出現のいずれに際しても, いわゆる adherent cell の存在が必要であつた。

e) PPD に反応性のリンパ球の分離

胸水リンパ球を PPD の存在下で48時間 *in vitro* で培養後, auto-RFC を形成し, Ficoll-Hypaque 比重遠心法でロゼットを分離した。赤血球を塩化アンモンで溶血し, ロゼットを多く含む分画と, 除いた分画を得, これらの分画を更に PPD で48時間刺激し, 再び auto-RFC を形成した。図5のカッコ内の数字は, 各ステップにおける auto-RFC を%で示した。PPD 刺激で出現した auto-RFC を除いた分画には, 再び PPD 刺激を行なつても, auto-RFC の増加はみられなかった。それぞれの分画を PPD で刺激し, 分裂幼若化反応を ^3H -チミジンの取り込みでみたところ, ロゼットを除いた分画には, PPD 刺激による分裂幼若化反応はみられなかった。

以上の成績をまとめると, 結核患者末梢血リンパ球の中には, 抗原ツベルクリン PPD に反応する Tリンパ球が2種類あること, 一つは PPD 刺激で IgG の Fc 部分に対する受容体をその表面に顕わしてくる Tリンパ球

(T_γ)であり、機能的には抑制的に働き、免疫反応系において調節的に作用する細胞である。そして、このような機能をもつ T_γ 細胞が、結核の特に難治症例群の末梢血リンパ球中に、PPD 刺激で増加することは、結核症の病態生理、またその治癒機点におけるリンパ球の果たす役割を考えるうえで興味深い。

いま一つの T リンパ球は、やはり PPD 刺激で増加する細胞であり、自己の赤血球に対する受容体をその表面に顕わしてくる細胞で機能的には effector として、免疫反応系に positive に働く細胞である。自己赤血球の T リンパ球への結合は、ヒツジ赤血球の T リンパ球への結合 (E-ロゼット) と同様に、免疫学的には非特異的であろう。おそらく、特異的あるいは非特異的な刺激により活性化され blast 化を起こした場合に、自己の赤血球と結合し、ロゼットを形成するものと考えられる。胸水リンパ球を PPD で刺激した場合、最高30%にも及ぶ auto-RFC の増加が観察されたが、これは PPD 反応性 T リンパ球の単なる clonal expansion のみによるのではなく、おそらく autologous MLR⁹⁾ や transstimulation¹⁰⁾ とよばれる機構が働いた結果だと考えられる。

以上の成績のように、T_γ と auto-RFC は、それぞれ別個の T リンパ球のサブセットに属し、また結核の病態や時期の違い等により、その出現を異にしている。したがって、この2種類の T リンパ球の動きを、結核の臨床症状との関連のもとに追求していくことは、結核免疫の、

特に細胞レベルでの解析、解明に大いに示唆に富む結果が期待されよう。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、常にご指導、ご助言をいただいた、本学会会長であられる恩師大阪大学教授山村雄一先生、ならびにこの研究に深いご理解をいただき今村賞に推薦して下さった大阪府立羽曳野病院長山本和男先生に深甚の謝意を表します。また、実際面で援助を受けた羽曳野病院白土裕江学士、貴重な PPD 製品を恵与下さった大阪大学微生物病研究所藤井久弥博士に感謝致します。

文 献

- 1) Tsuyuguchi, I. and Kohmo, T.: *Am. Rev. Respir. Dis.*, 112 : 535, 1975.
- 2) 露口泉夫他：結核, 52 : 219, 1977.
- 3) 露口泉夫：結核, 53 : 601, 1978.
- 4) Tsuyuguchi, I. et al.: *Am. Rev. Respir. Dis.*, 121 : 951, 1980.
- 5) Kishimoto, S. et al.: *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 34 : 544, 1968.
- 6) Hirano, T. et al.: *J. Immunol.*, 119 : 1235, 1977.
- 7) Sandilands, G. et al.: *Lancet*, 1 : 27, 1974.
- 8) Fournier, C. and Charreire, J.: *J. Immunol.*, 121 : 771, 1978.
- 9) Weksler, M.E.: *J. exp. Med.*, 137 : 799, 1973.
- 10) Augustin, A. A. et al.: *Eur. J. Immunol.*, 9 : 665, 1979.