

Immunohistologic Characterization and Clinical Assessment of Activated Lymphocytes Expressing a Nuclear Antigen Reactive with "Ki-67" Monoclonal Antibody in the Peripheral Blood and Lymphoid Tissues

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8042

末梢血, リンパ組織における“Ki-67”核抗原を発現した 活性化リンパ球の免疫組織学的性状とその臨床的意義

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

生 田 敬 定

(昭和63年5月12日受付)

モノクローナル抗体 Ki-67 は、ヒト組織内の細胞で G₀ 期以外の細胞周期にあるものに発現する核増殖抗原を認識する。本研究において、モノクローナル抗体 Ki-67 を使用して様々なリンパ球の免疫組織化学染色を行い、Ki-67 核抗原の発現が、生体内におけるリンパ球活性化の指標となり得るかどうか検討した。健康人より得られた末梢血リンパ球においては、Ki-67 抗体で認識される核抗原はほとんど発現されていなかった。しかし、生体外において細胞分裂促進物質により刺激された場合、刺激されたリンパ球のほとんどにこの核抗原が強く発現していた。伝染性単核症、麻疹、流行性耳下腺炎、水痘などの一般的ウイルス感染症急性期末梢血リンパ球のかなりの細胞の核上に特徴的に、Ki-67 と反応する抗原が発現されていた。免疫二重染色においてこれらの Ki-67 陽性細胞は、T細胞の膜形質を持ち、cluster designation (CD) 4 (ヘルパー/インデューサーサブセット) もしくは CD8 (サブプレッサー/サイトトキシックサブセット) の膜形質を合わせて示していた。例えば、伝染性単核症急性期の患者より得られた末梢血リンパ球の30~50%に Ki-67 核抗原が認められ、回復期には消失していた。この疾患における Ki-67 陽性細胞のほとんどは CD8 陽性であったが、他のウイルス疾患では、CD4、CD8 両T細胞サブセットに存在していた。Ki-67 陽性細胞は他のリンパ球に比して大型の細胞であった。対照的に、化膿性髄膜炎、化膿性骨髄炎、百日咳など病原体の排除に細胞性免疫が中心的役割を果さない細菌感染症においては、Ki-67 陽性細胞の出現は認められなかった。一方、マイコプラズマ肺炎の急性期においても、Ki-67 陽性細胞の著明な増加が認められ、この疾患においてもウイルス感染症と同様な免疫応答が起っていることが示唆された。川崎病や特発性心筋炎においても、末梢血中に Ki-67 陽性細胞の増加が認められ、比較的長く存在していた事実は興味ある所見で、いまだに不明なこれら疾患の病因が、ウイルスである可能性を示すものであった。一般的にリンパ節、扁桃、脾臓のB細胞領域である二次濾胞の胚中心には、多くの Ki-67 陽性細胞が認められたが、T細胞領域には極くわずかに認められるにすぎなかった。これらの結果より、B細胞増殖の場はほとんどがリンパ組織に限られているのに対して、ウイルスやそれに関連した要因によって刺激された活性化T細胞は、末梢血中にも出現する可能性が示唆された。ウイルス感染症やその関連疾患において末梢血中に Ki-67 陽性細胞が増加し、細菌感染症において認められなかったことは、ウイルス感染と細菌感染の鑑別の有用な手段となると考えられた。

Key words nuclear proliferation antigen, Ki-67 monoclonal antibody, double immunohistochemical staining, activated T-cell, viral infection

Abbreviations: ABC, avidin-biotin peroxidase complex; AET, 2-aminoethylisothiouronium bromide; APAAP, alkaline phosphatase monoclonal anti-alkaline phosphatase; BSA, bovine serum albumin; CD, cluster designation; EBV, Epstein-Barr virus; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; GC, germinal center; ³H-TdR,

モノクローナル抗体 Ki-67 は、Gerdes ら¹⁾ によってホジキン病由来の細胞株である L428 細胞の核断面を抗原として作製されたモノクローナル抗体である。この抗体はヒト組織内の増殖期の中の G₁ 後期、S 期、G₂ 期、M 期にある細胞の核内に発現する抗原を認識するとされる。in vitro の検索によれば、Ki-67 核抗原の発現はタンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミド (cycloheximide) によって阻害され、この抗原は細胞増殖に伴って新たに発現する核タンパクの一種と推察されている²⁾。悪性リンパ腫、乳癌、脳腫瘍などにおいて、Ki-67 核抗原陽性率とこれら腫瘍細胞の増殖能、ことに悪性度との相関が高く、予後判定の指標としての有用性が注目されている^{3,4)}。一方、正常リンパ球においても in vitro で phytohemagglutinin (PHA) 刺激で活性化された場合、Ki-67 核抗原は新たに発現してくる⁵⁾。リンパ球の活性化に伴って発現する膜抗原として、インターロイキン-2 レセプター (interleukin-2 receptor)、トランスフェリンレセプター (transferrin receptor)、HLA-DR 抗原などが知られているが⁶⁻¹²⁾、この Ki-67 核抗原の発現も in vitro のみならず生体内における T 細胞の活性化の指標となり得る可能性が推測される。本研究では、種々ウイルス感染症、ウイルスが病因ではないかと疑われている疾患、ウイルス近似の性格をもつマイコプラズマ感染症、さらには比較のため細菌感染症において、末梢血リンパ球における Ki-67 核抗原発現状態の検索を行い、末梢血リンパ球における Ki-67 核抗原発現の臨床的意義について検討した。また、一種の抗原刺激試験として細胞性免疫能を総合的にスクリーニングする検査として用いられたり、種々の免疫応答における細胞間相互作用を制御する自己認識機構の異常を検索する検査として用いられているリンパ球混合培養試験 (mixed lymphocyte reaction, MLR) における Ki-67 核抗原発現状態、生体内リンパ組織としてのリンパ節、扁桃、脾臓における Ki-67 核抗原の分布についても合わせて検討した。

対象および方法

I. 対 象

伝染性単核症、麻疹、水痘、流行性耳下腺炎、川崎

病、特発性心筋炎 (症)、マイコプラズマ肺炎、百日咳、化膿性骨髓炎、化膿性髄膜炎の患児より静脈血をヘパリン加採血した。流行性耳下腺炎に合併した無菌性髄膜炎患児より得られた髄液中リンパ球も対象とした。正常コントロールとした小児の末梢血は、当科外来を受診した3ヶ月から15才の小児で感染症の疑いがなく、副腎皮質ホルモン剤、免疫抑制剤などの服用のないものより、成人の末梢血は健康な26~34才のボランティアよりヘパリン加採血した。扁桃は扁桃炎により扁桃摘出術を受けたものを、リンパ節、脾臓については、胃潰瘍、胃癌、小腸ポリープなどに開腹手術を受けたもので、腫瘍細胞の認められないものを使用した。

II. 末梢血リンパ球の分離

採血されたヘパリン加静脈血をリン酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS, pH7.4) にて約2倍に希釈し、Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nyegarrd & Co., Oslo, Norway) を用いた比重遠心法¹³⁾ にて単核球を得た。単核球は L-グルタミン (0.3ng/ml)、ペニシリン (200U/ml)、ゲンタマイシン (10μg/ml)、Hepes 緩衝液 (0.02M, GIBCO, Grand Island, NY)、10%非動化ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS) を含む RPMI1640 培地 (GIBCO) にて調製し、さらに、プラスチック皿 (No. 3002, Falcon Plastics, Oxnard, CA) を用いて付着細胞を除去し、非付着細胞をリンパ球として用いた。

III. リンパ球混合培養試験 (MLR)

非自己リンパ球混合培養試験 (allogenic MLR) は、成人リンパ球を前述した RPMI1640 培地にて 1×10^6 /ml に調節、スティミュレーター (stimulator) を X 線照射装置 (東芝 KXC-18-2A 形、東京芝浦電気株式会社、東京) を使用して 4000rad 照射し、同数のレスポンダー (responder) と混合し、13×100 mm のプラスチック培養試験管 (No. 2027, Falcon Plastics) を用い炭酸ガス培養恒温器 (37°C, 5% CO₂) 内で3日間培養した。

自己リンパ球混合培養試験 (autologous MLR) は、成人リンパ球を 2-aminoethylisothiuronium bromide (AET) 処理ヒツジ赤血球を用いた E-ロゼット沈降法¹⁴⁾ にて、E-ロゼット形成細胞と非形成細胞に分離し、E-ロゼット非形成細胞を

tritiated thymidine; IM, infectious mononucleosis; IPN, infantile polyarteritis nodosa; MLR, mixed lymphocyte reaction; PAP, peroxidase-antiperoxidase; PBS, phosphate buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PE, phycoerythrin; PHA, phytohemagglutinin; PN, polyarteritis nodosa; TBS, tris-buffered saline.

4000rad 照射した後混合し, allogenic MLR と同様の方法で3日間培養した。

IV. 細胞塗抹標本の作製

末梢血リンパ球は10% FCS 加 PBS にて 2×10^5 /ml に調節, 培養細胞は再度 Ficoll-Hypaque 比重遠心法により得られた生細胞を同数に調節した。その0.5ml, 1×10^5 の細胞を細胞遠心沈殿装置 (Cytospin 2, Shandon Southern Products Ltd., England) を使用して, 8 分間, 800回転にてスライドガラス上に遠沈し, 塗抹標本を作製した。直ちにドライヤーを使い20~30分間室温にて風乾後, アルミホイルに包み, -20°C にて保存した。

V. 凍結組織切片の作製

組織や細胞の自己融解, 抗原の移動流出を防ぎ, 組織の構築を可能な限りあるがままに保存するために, 採取された組織をすみやかに $5 \times 5 \times 3$ mm 程度の大きさとし, 凍結用包埋剤 O.C.T. コンパウンド (O.C.T. compound, Tissue-Tek, Miles Scientific, Naperville, IL) に包埋した。凍結した組織はクリオスタット (cryostat, Tissue-Tek II, Miles Scientific) を使い, 厚さ $6 \mu\text{m}$ の凍結切片を作製

し, それをアルブミンを塗布したスライドガラス上に乗せ付着させ, 20~30分間ドライヤーにて室温風乾後, アルミホイルに包み, -20°C にて保存した。

VI. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体 Ki-67 (IgG₁, kappa) は DAKO Co., Copenhagen, Denmark より入手。モノクローナル抗体抗 Leu-3a [IgG₁, helper subset, cluster designation (CD) 4], 抗 Leu-2a (IgG₁, suppressor/cytotoxic subset, CD8), 抗 HLA-DR (IgG₁) はビオチン標識のものを使用 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA)。T細胞, B細胞の同定には, モノクローナル抗体抗 Leu-1 (IgG_{2a}, CD5), 抗 Leu-14 (IgG_{2b}, CD22) を使用 (Becton Dickinson)。抗アルカリフォスファターゼモノクローナル抗体 (DAKO Co.) はアルカリフォスファターゼと反応, アルカリフォスファターゼ抗アルカリフォスファターゼ複合体を形成, alkaline phosphatase monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP) 法¹⁰⁾に使用。フローサイトメーター (flowcytometer) には, フィコエリスリン (phycoerythrin, PE) 標識モノクローナル抗体抗

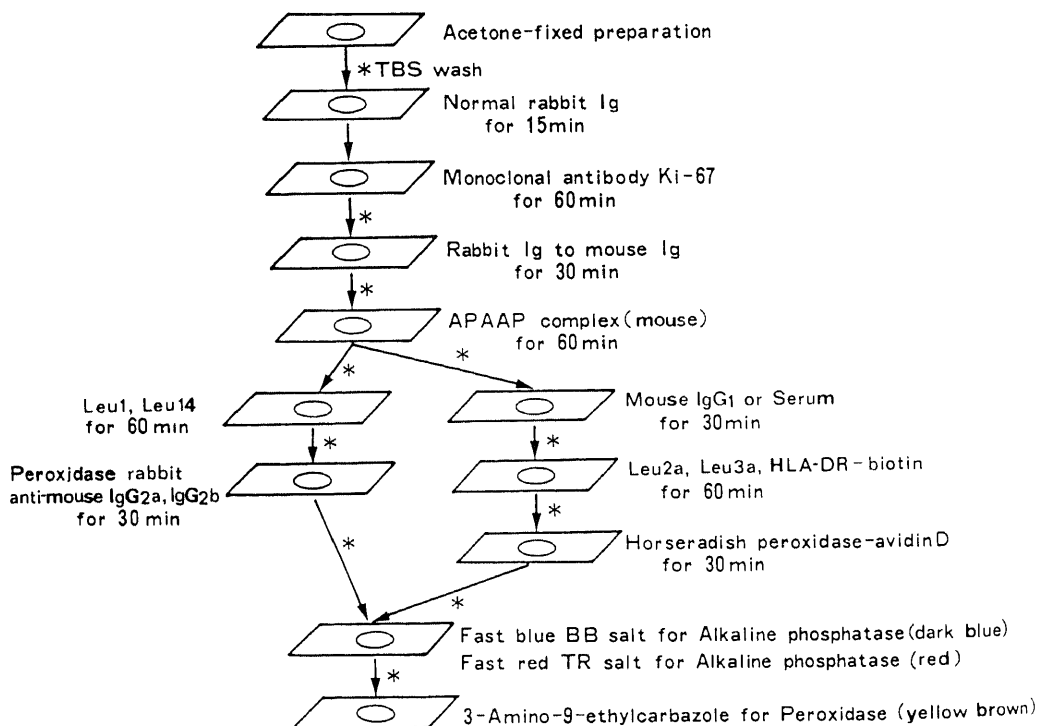


Fig. 1. Double immunohistochemical staining procedure.

Leu-2a (IgG₁, CD8) を使用 (Becton Dickinson).

Ⅶ. 免疫染色

使用した各抗体の希釈は成牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA, SIGMA) 0.1% 加トリス塩酸緩衝液 (tris-buffered saline, TBS, pH7.4) にて行い、反応は室温、湿潤箱中で乾燥を防止して行った。スライド標本を2～10時間4℃冷アセトン固定後、ドライヤーにて数分間風乾、4%正常ウサギ免疫グロブリン15分間、標本上のものを除去し、洗浄せずに、20倍希釈した Ki-67 と60分間反応させた。TBS にて5分間3回洗浄後、30倍希釈の抗マウスウサギ免疫グロブリンと30分間反応させた。TBS にて同様に洗浄後、APAAP と60分間反応させた。次に、TBS にて洗浄後、マウス IgG₁ (200μg/ml) または10倍希釈正常マウス血清で30分間ブロック、TBS にて洗浄、20倍希釈のビオチン標識モノクローナル抗体抗 Leu-3a, 抗 Leu-2a, 抗 HLA-DR と60分間反応させた。さらに TBS にて洗浄後、30倍希釈の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識アビジン-D (Vecter Laboratories, Inc., Burlingame, CA) と30分間反応させた。この後、APAAP 法では Ki-67 のみの発色は、Fast red TR salt (SIGMA) にて赤色に、アビジン-ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体 (avidin biotin-peroxidase complex, ABC) 法¹⁰⁾¹⁷⁾ との免疫二重染色には、Fast blue BB salt (SIGMA) を用いて暗青色に発色させた。ABC 法は、3-amino-9-ethyl-carbazole (SIGMA) にて黄褐色に発色させた。

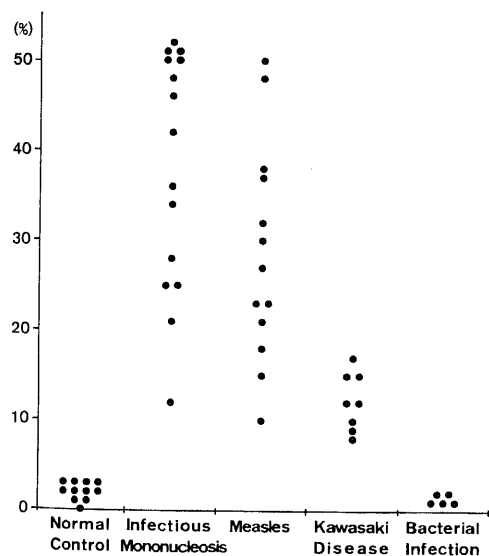


Fig.2. Percentage of Ki-67 nuclear antigen positive cells in peripheral blood lymphocytes from various diseases.

T細胞, B細胞の同定については、20倍希釈モノクローナル抗体抗 Leu-1, 抗 Leu-14 と、20倍希釈ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG_{2a} ウサギ免疫グロブリン, ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG_{2b} ウサギ免疫グロブリン (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA) を組み合わせたペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ (peroxidase-antiperoxidase, PAP) 法¹⁰⁾ と APAAP 法との免疫二重染色を行った。単染色のものに対しては、カラッチヘマトキシリン核染色液にて核染色を行った (図1)。

Ⅷ. 伝染性単核症末梢血リンパ球の *in vivo* における活性化

伝染性単核症患児末梢血より分離されたリンパ球を10% FCS 加 RPMI1640 培地にて、 5×10^5 /ml に調節した。この細胞浮遊液 0.2ml を96穴平底マイクロプレート (No. 3072, Falcon Plastics) を使用し、³H 標識チミジン (tritiated thymidine, ³H-TdR, New England Nuclear) を各穴に 0.2μCi ずつ添加し、24時間後に ³H-TdR の取り込みを液体シンチレーションカウンター (LSC-700, アロカ, 東京) にて測定した。

Ⅸ. 伝染性単核症末梢血リンパ球のフローサイトメーター免疫二重染色

伝染性単核症患児末梢血より分離されたリンパ球 1×10^7 をアセトンにて10分間室温固定、1% BSA 加 PBS にて1回、5% FCS 加 PBS にて2回洗浄後、40倍希釈モノクローナル抗体 Ki-67 と30分間反応させた。5% FCS 加 PBS にて3回洗浄、40倍希釈フルオレスセインイソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識ヤギ抗マウス IgG (Cappel Laboratories, West Chester, PA) と30分間、同様に3回洗浄、20倍希釈 PE 標識モノクローナル抗体抗 Leu-2a と30分間反応させ、さらに3回洗浄後、フローサイトメーター (EPICS-C, Coulter Electronics, Hialeah, FL) にて解析した¹⁹⁾²⁰⁾。

成 績

I. 正常末梢血リンパ球およびリンパ球混合培養試験 (MLR)

正常小児6例, 成人5例ともに末梢血リンパ球中で Fast red TR salt で赤く核小体様、もしくは顆粒状に発色されてくる Ki-67 核抗原の陽性細胞数は、全て3%以下であった (図2)。一方, allogenic MLR においても, autologous MLR においても Ki-67 陽性細胞の増加が観察され、多くが大型化した細胞で核小体様、顆粒状に染色されていた (図3)。

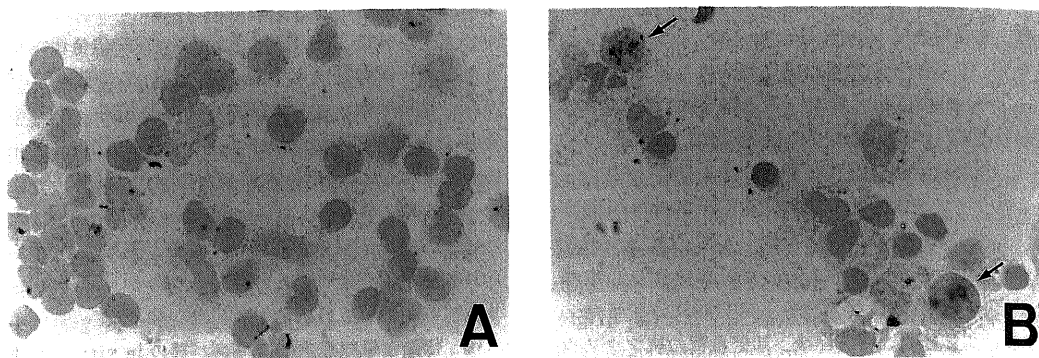


Fig. 3. Ki-67 nuclear antigen expression of normal peripheral blood lymphocytes unstimulated (A) and stimulated with autologous MLR (B) are stained by APAAP technique. It is noted that stimulated, but not unstimulated, lymphocytes express strongly Ki-67 nuclear antigen (arrows). Nuclei are stained by Carazzi's Hematoxylin. ($\times 1320$).

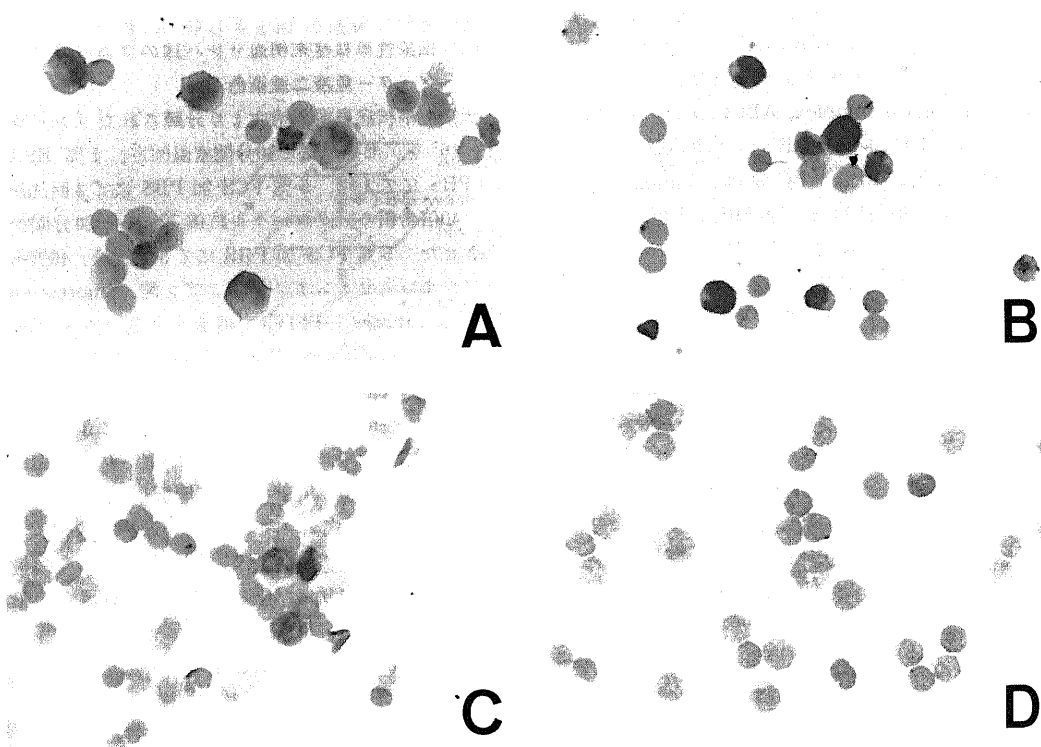


Fig. 4. Ki-67 nuclear antigen expression of peripheral blood lymphocytes from the patients with various viral infections are stained red by APAAP technique. Infectious mononucleosis (A). Measles (B). Kawasaki disease (C). Normal (D). Nuclei are stained by Carazzi's Hematoxylin. ($\times 1320$).

Table 1. Surface phenotypes of cells having Ki-67 nuclear antigen

	(n) ^a	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Infectious Mononucleosis	(8)	6.8±1.9 ^b	93.0±2.0
Measles	(7)	45.1±4.7	49.9±4.7
Kawasaki Disease	(5)	76.8±6.9	19.6±4.6

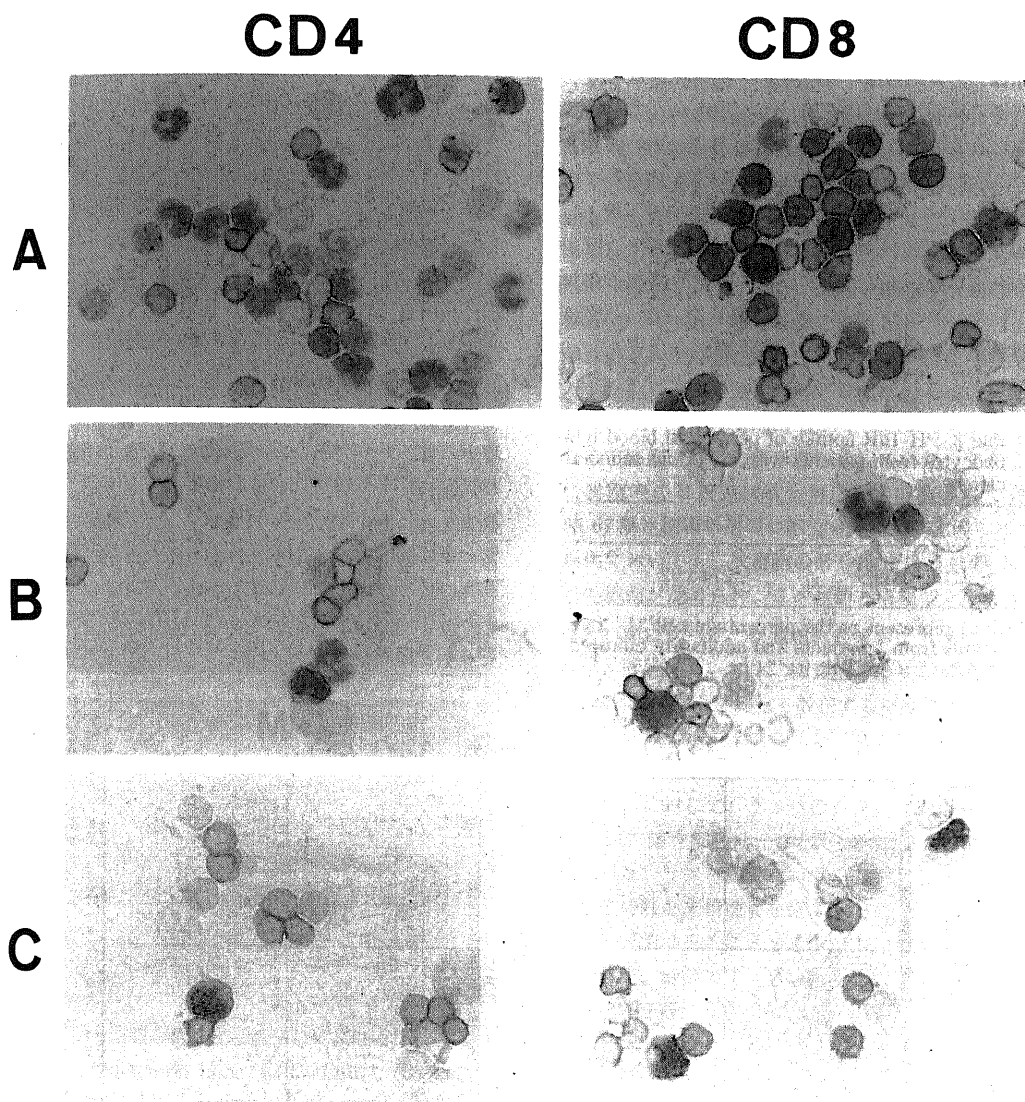
^a Number of patients.^b Data represent as the percentage±SEM of Ki-67 nuclear antigen positive cells.

Fig. 5. The relationship of Ki-67-positive cells to surface phenotype. Ki-67 nuclear antigen is stained blue and surface phenotype CD4 or CD8 is stained brown by double immunohistochemical staining. Almost all Ki-67 nuclear antigens are found on CD8-positive cells in infectious mononucleosis (A). Ki-67 nuclear antigens distribute on both CD4- and CD8-positive cells in measles (B). Ki-67 nuclear antigens are present dominantly on CD4-positive cells in Kawasaki disease (C). ($\times 1320$).

Ki-67 陽性細胞の膜形質については, allogenic MLR, autologous MLR とともに CD4 陽性のヘルパー形質をもつものが多く認められた。

II. ウイルス感染症

1. 伝染性単核症

急性期には50%にも達する Ki-67 陽性細胞の出現が確認され, 病勢の消退とともに減少し, 回復期にはほとんど認められなくなった (図2)。これらの Ki-67 陽性細胞のほとんどは大型の細胞で, 核が切れ込みを示したり馬蹄形をとったりしており, リンパ芽球様, 形質細胞様などの形態的多様性を示した, いわゆる異型リンパ球と思われた (図4)。免疫二重染色による Ki-67 陽性細胞の膜形質は CD5 陽性, CD22 陰性のT細胞で, ほとんどが CD8 陽性のサブレッサー/サイトトキシックT細胞であった (表1)

(図5)。また, 末梢血リンパ球の ^3H 標識チミジンの取り込みは, 正常コントロールに比し著明に増加していた (表2)。フローサイトメーターによる免疫二重染色の解析でも, Ki-67 陽性細胞のほとんどが

Table 2. ^3H -TdR uptake of peripheral blood lymphocytes from patients with infectious mononucleosis

Patient	Control
3377 ± 839^a	274 ± 92

^a Data represent as the percentage $\pm$ SEM. Lymphocytes from 3 patients and adults are cultured with $0.2\mu\text{Ci}$ of ^3H -TdR for 24 hr.

CD8 陽性であった (図6)。

2. 麻疹

麻疹と臨床診断のつく Koplik 斑出現の頃より Ki-67 陽性細胞の出現が確認され, 麻疹特有の発疹出現後1~2日目の極期には35%~50%の Ki-67 陽性細胞が認められた (図2) (図4)。これらの Ki-67 陽性細胞は, 発疹が消退し回復期に入るとともに減少していった。Ki-67 陽性細胞の多くは大型の細胞で, その染色性も極期には核小体様のものが多く, 回復期には顆粒状のものが増加する傾向にあった。免疫二重染色でみた Ki-67 陽性細胞の膜形質は, CD5 陽性, CD22 陰性でありT細胞であったが, そのT細胞サブセットでは, CD4, CD8 両T細胞が存在していた (表1) (図5)。

3. 水痘

20~30%の Ki-67 陽性細胞が末梢血リンパ球中に確認され, 多くが大型の細胞であった。Ki-67 陽性細胞は, CD4, CD8 両T細胞サブセットに存在していた。

4. 流行性耳下腺炎

耳下腺腫脹中の流行性耳下腺炎患児末梢血リンパ球中には, 30~40%の Ki-67 陽性細胞が出現していた。流行性耳下腺炎に合併した無菌性髄膜炎での髄液中リンパ球においても, Ki-67 陽性細胞が30~35%と多く認められた。いずれにおいても Ki-67 陽性細胞の多くは大型の細胞であった。末梢血中, 髄液中ともに Ki-67 陽性細胞は, CD4, CD8 両T細胞サブセットに分布していた。

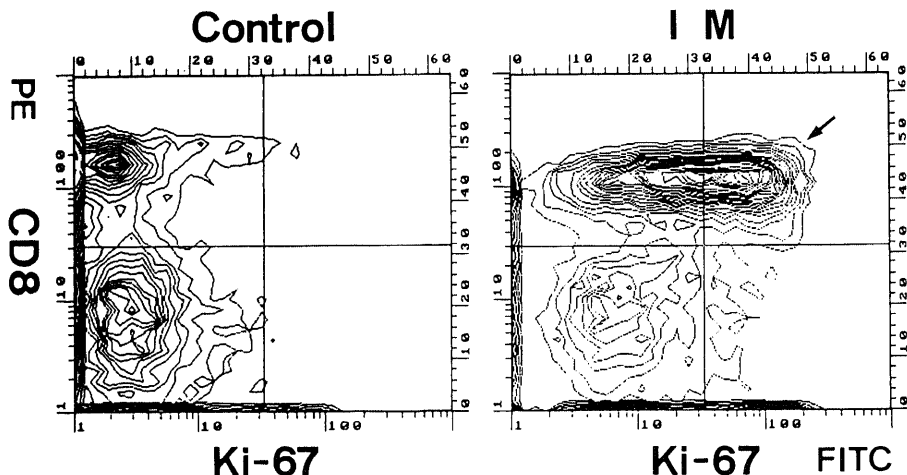


Fig.6. Two-color immunofluorescence analysis of Ki-67 nuclear antigen-expressing cells by a flow cytometry. It is shown that many CD8⁺ cells in patients with infectious mononucleosis (IM) express Ki-67 nuclear antigen (arrow).

III. 川崎病, 特発性心筋炎 (症)

川崎病, 特発性心筋炎 (症) ともに急性期には, 末梢血リンパ球中に Ki-67 陽性細胞の増加が観察され, 比較的長期にわたり存在することが確認された (図2) (図4). 特に川崎病においては, Ki-67 陽性細胞の多くが CD4 陽性のヘルパー形質をもつものであ

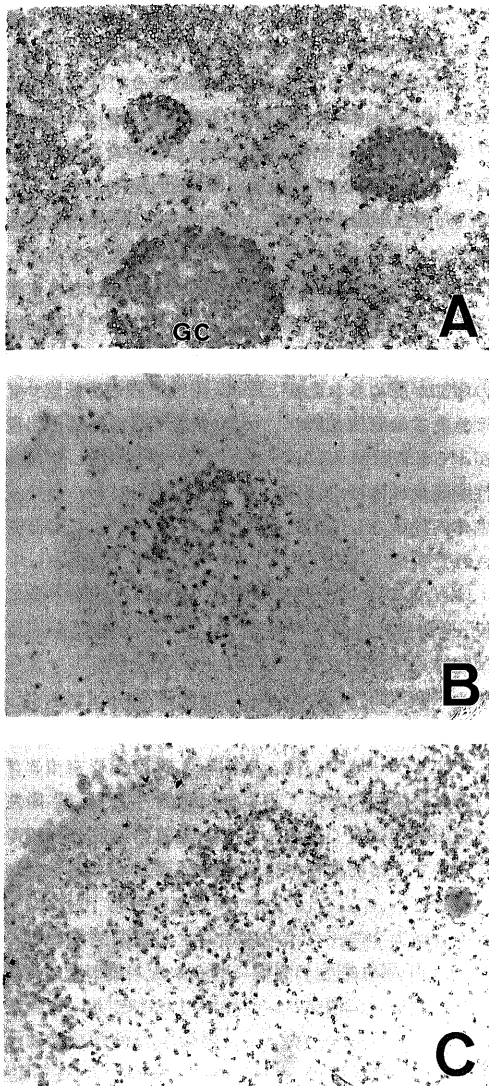


Fig. 7. (A) lymph node, Ki-67/Leu 1. (B) tonsil, Ki-67/Leu 14. (C) tonsil, Ki-67/Leu 2a. The distribution of cells expressing Ki-67 nuclear antigen in lymphoid tissues. Ki-67-positive cells, which are stained blue, are marked in the germinal center of secondary follicles, but a few positive cells are present in an interfollicular region. GC, germinal center. ($\times 330$).

た (表1) (図5).

IV. マイコプラズマ肺炎

ウイルス感染症と同様に Ki-67 陽性細胞の増加が認められた. Ki-67 陽性細胞は, CD4, CD8 両 T 細胞サブセットに分布していた.

V. 細菌感染症

百日咳 2 例, 化膿性骨髓炎 2 例, 化膿性髄膜炎 1 例の末梢血リンパ球では, ウイルス感染症, マイコプラズマ肺炎と異なり, Ki-67 陽性細胞の増加は全く認められなかった (図2).

VI. リンパ組織の免疫染色

リンパ節 15 例, 扁桃 5 例, 脾臓 3 例について作製した凍結組織切片に免疫二重染色を行い検討した. リンパ節においては, 濾胞内に Ki-67 陽性細胞が認められたが, そのほとんどが二次濾胞内の胚中心に多数認められたもので, 一次濾胞内には極少数存在しているにすぎなかった. これら濾胞内の Ki-67 陽性細胞の多くは, 核小体様に染色されていた. Ki-67 陽性細胞の膜形質は, ほとんどが CD22 陰性であった. 濾胞周辺の T 細胞領域にも検体によっては, 散在性に Ki-67 陽性細胞を認める例があったが, これらは T 細胞としての膜形質を示していた. このように濾胞内の B 細胞領域と周辺の T 細胞領域では, Ki-67 陽性細胞の出現に際立った相違が認められた. 扁桃においても二次濾胞の胚中心には多数の Ki-67 陽性細胞が認められ, リンパ節と同様であったが, リンパ節に比べて二次濾胞の形成がより多く認められた. 脾臓においては二次濾胞の形成が少なく, 濾胞内の Ki-67 陽性細胞も散在する程度であった. ウイルス感染症患児末梢血リンパ球における Ki-67 陽性細胞の染色性が, 核小体様から顆粒状まで種々であったのに対して, リンパ節, 扁桃における胚中心の Ki-67 陽性細胞は, ほとんどが核小体様に染色されていた. リンパ節においてリンパ球は傍皮質領域にある特殊な末梢血管を経て, 血液中から節内に入り, T 細胞はそこにとどまるが, B 細胞はリンパ濾胞に移動, 最後に T, B 細胞ともに髄洞に移り輸出リンパ管を経て血中にもどり, 再循環のサイクルに入るという流れをもっているが, この流れによる染色性の差違は認められなかった (図7).

考 察

モノクローナル抗体 Ki-67 は, ホジキン病由来の L428 細胞の核分画を抗原として作製された抗体であり¹⁾, 細胞周期の G₂ 後期, S 期, G₂ 期, M 期にある細胞を認識するとされており, G₀ 期, G₁ 前期にある

細胞とは全く反応を示さない²⁾。このため悪性の増殖性疾患である悪性リンパ腫、乳癌、脳腫瘍などにおいて、これらの腫瘍細胞における Ki-67 陽性細胞率と悪性度との相関について検討され、モノクローナル抗体 Ki-67 の悪性度判定に関する有用性が報告されている³⁻⁵⁾。また、PHA 刺激正常末梢血リンパ球においても、増殖反応と同時に新たに発現してくる Ki-67 核抗原が確認されている²⁾。Ki-67 陽性細胞は、悪性増殖性疾患と PHA などの細胞分裂促進物質刺激末梢血リンパ球以外に、扁桃の濾胞、胸腺皮質と粘膜上皮など、細胞の分裂増殖の盛んな場所において認められるのみである。今回、悪性疾患以外の疾患、しかもその末梢血中における Ki-67 陽性細胞の増加を明らかにしたが、このような報告はみられない。これは感染の成立後、感染細胞の排除に T 細胞が深くかかわる種々のウイルス感染症やマイコプラズマ感染症における患児末梢血中に認められたもので、Ki-67 核抗原の発現状態を通じその臨床的意義について、また、リンパ組織における Ki-67 核抗原の発現との関連について検討した。

Epstein-Barr virus (EBV) により引き起こされる伝染性単核症は、EBV の感染を受けた B 細胞の刺激に反応して末梢血中に異型リンパ球が出現、増加するのが特徴である。これらの異型リンパ球のほとんどは T 細胞とされている。Ki-67 陽性細胞は、リンパ球数が増加し異型リンパ球の多くなる急性期には、40～50% にも増加する例があり、そのほとんどが CD8 陽性でサプレッサー/サイトキシン形質をもっていた。これは以前より報告されている CD8 陽性細胞の著しい増加、CD4/CD8 比の著明な低下という伝染性単核症に特徴的な T 細胞サブセットの変動^{20,21)}と一致していた。活性化された T 細胞は、EBV の感染した B 細胞に対して特異的に細胞障害性に働き、B 細胞の増殖を抑制している。伝染性単核症においては、B 細胞数減少にもかかわらず、HLA-DR 抗原陽性細胞の増加することが、活性化された T 細胞の存在を示している。この HLA-DR 抗原の発現と同様に、Ki-67 核抗原の T 細胞における発現もまた、刺激を受け活性化され増殖期に入り発現されてくるという発現機序から、T 細胞の活性化の指標として有用と考えられた。さらに、Ki-67 核抗原の発現が、末梢血においてはほとんど T 細胞に限られており、B 細胞との乖離をみねばならない HLA-DR 抗原に比し、より臨床的に有用と考えられる。患児末梢血リンパ球における ³H 標識チミジンの取り込みの著明な亢進も、T 細胞活性化を示しているも

のと思われた。また、細胞塗抹標本で Ki-67 陽性細胞の多くが大型の細胞で、核が切れ込みを示したり馬蹄形をした形態的多様性のある異型リンパ球であったことは、形態学的にも活性化が証明されているものと考えられた。

麻疹においては、Koplik 斑出現前後より Ki-67 陽性細胞が確認され、病勢により白血球減少、比較的リンパ球増多のみられる時期に Ki-67 陽性細胞が増加し、発疹の消退、回復とともに減少してきていた。末梢血にみられる Ki-67 陽性細胞はそのほとんどが CD5 陽性、CD22 陰性で T 細胞と考えられ、HLA-DR 抗原はその一部に発現していた。免疫の成立から回復にという麻疹の臨床経過中において、Ki-67 陽性細胞の T 細胞サブセットに特徴的な変化はなく、CD4、CD8 両サブセットに認められたが、この点は EBV 感染による伝染性単核症と大きな違いであった。

水痘、流行性耳下腺炎においても Ki-67 陽性細胞の増加が認められたが、Ki-67 陽性細胞の T 細胞サブセットでは麻疹と同様、CD4、CD8 陽性細胞に出現がみられた。さらに流行性耳下腺炎に合併した無菌性髄膜炎における髄液中という、末梢血とは異なる生体内局所としての環境下でも存在することが確認された。

マイコプラズマ肺炎でも末梢血リンパ球中には Ki-67 陽性細胞が増加しており、病変の成立、消退に細胞性免疫が中心をなしているマイコプラズマのウイルス近似の性格によるものと考えられた。

一方、百日咳、化膿性骨髄炎、化膿性髄膜炎患児の末梢血リンパ球中には、ウイルス感染症やマイコプラズマ感染症においてのような特徴的な Ki-67 陽性細胞の増加は全く認められず、細菌感染症とウイルス感染症では病原体の排除機構が異なることをうかがわせた。

以上のように、ウイルス感染症と細菌感染症の間で、Ki-67 陽性細胞の出現に明らかな差違が認められることより、末梢血リンパ球中における Ki-67 陽性細胞増加の有無は、ウイルス感染症と細菌感染症の鑑別の有用な手段の一つになると思われた。さらに、ウイルス感染という刺激で活性化された T 細胞が Ki-67 核抗原を発現しているのであり、Ki-67 核抗原は末梢血中における T 細胞の活性化抗原の一つと考えられる。

川崎病は、5 日以上続く発熱・四肢末端の変化・不定形発疹・両側眼球結膜の充血・口唇の紅潮、いちご舌、口腔咽頭粘膜のびらん性発赤・急性期にお

ける非化膿性頸部リンパ節腫脹の6つを主要症状とし、血管炎を基盤とすると思われる疾患である。冠動脈瘤と血栓性閉塞による突然死をきたす事例があり注目されている疾患であるが、その病因は十分明らかにされていない。最近、川崎病患児の末梢血リンパ球の培養上清中に、レトロウイルスに特徴的な逆転写酵素 (reverse transcriptase) 活性の上昇を認め、川崎病がレトロウイルス感染によるものではないかと Shulman ら²⁰や、Burns ら²⁰によって報告されている。また、EBV についても非常に弱いものであるが抗体上昇があり、初感染の抗体パターンをとっていると報告され²⁰、病因をウイルスに求める考えがある。急性期の川崎病患児の末梢血リンパ球中に、Ki-67 陽性細胞の増加が観察され、比較的長期にわたって流血中に存在することが確認された。このことはウイルス感染症と細菌感染症での Ki-67 陽性細胞の出現の差違から、川崎病におけるウイルス説との関係が興味深い所見であった。Ki-67 陽性細胞の多くが CD4 陽性のヘルパー形質をもつものであったことは、従来いわれている川崎病における免疫学的変動、すなわち、急性期には CD8 陽性のサブプレッサー/サイトトキシック形質をもつものが減少し、HLA-DR 抗原をもつ活性化された CD4 陽性のヘルパー形質をもつものが増加しているとの報告^{20,21}と合致していた。HLA-DR 抗原をもつ活性化された CD4 陽性細胞と、Ki-67 陽性 CD4 陽性細胞は同一の細胞で、この点からも Ki-67 核抗原は末梢血中における T 細胞の活性化抗原と考えられる。病理学的にみれば、川崎病の典型例は冠動脈を中心とする結節性多動脈炎 (polyarteritis nodosa, PN) であり、成人にみられる PN と区別される乳児型結節性多動脈炎 (infantile polyarteritis nodosa, IPN) とされるが、筆者の経験によれば PN 患者の末梢血リンパ球中に Ki-67 陽性細胞の増加は認められていない。

川崎病と同様にウイルス感染の可能性を疑われながら確証の得られていない特発性心筋炎 (症) においても、急性期には末梢血リンパ球中に Ki-67 陽性細胞の増加が確認され、これも病因がウイルス感染の可能性を示すものと思われた。

ウイルス感染に対する免疫の様式には多くの複雑な要因が関与し、さらに多くのウイルスが免疫反応の担い手であるリンパ球にも感染し、これらの細胞の機能に様々な影響を及ぼすことが一層複雑にしている。ウイルス感染における防御機構で細胞性免疫の細胞障害性 T リンパ球の抗原認識においてもいろいろなモデルが唱えられているが、その一つにウイ

ルスに修飾された自己抗原を考える変容自己 (altered self) モデルがある^{20,29}。この変容自己を細胞障害性 T リンパ球が認識し、活性化されるモデルの一面をとらえているのが、autologous MLR における Ki-67 核抗原の発現により示される T 細胞の活性化ではないかと考えられる。

Ki-67 核抗原は、リンパ組織の凍結切片において、B 細胞の分化増殖の場である二次濾胞の胚中心に強く発現されており、外套に存在する小リンパ球が胚中心に入り、トランスフォームして分裂増殖し、再びリンパ濾胞の外部で小リンパ球や形質細胞に成熟していくと考えられていること^{30,31}と合致している。また、Ki-67 陽性細胞の多くが CD22 陰性であったが、この抗原は B 細胞の活性化で失われ、胚中心の B 細胞には弱いかほとんど発現されないものであり³⁰、この点でも一致していた。これに対して、T 細胞は機能面に関する研究が進んでいるものの分化増殖の場については不明な点が多い。活性化され増殖期にある細胞に発現する Ki-67 核抗原が、白血病などの特殊な病態を除いて、ウイルス感染症、マイコプラズマ感染症の末梢血リンパ球中の T 細胞に確認され、末梢血中に B 細胞の増加するといわれている百日咳で認められなかったことは、T 細胞と B 細胞の活性化、増殖の場の違いを示しているものと推測される。しかし、リンパ組織において活性化され増殖期にある T 細胞が、その状態のまま末梢血中に動員されているにすぎない可能性もある。リンパ組織内と末梢血中での Ki-67 核抗原の発現状態の差違をみても、特殊な病態以外での末梢血中における Ki-67 核抗原は、活性化 T 細胞に発現するものと考えられ、HLA-DR 抗原とともに T 細胞活性化の指標となり得るものである。

全身性エリテマトーデス患者血清中の自己抗体が発見の糸口となった増殖性細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA/cyclin) が知られている^{33,36}。この PCNA は、分子量 36kD の核タンパクであり、DNA 合成に先立ち細胞周期の G₁後期から S 期、G₂期、M 期にかけて発現する。Ki-67 核抗原も核タンパクの一つと考えられ、細胞周期における発現時期も似かよっており、今後の研究においてその異同が明らかにされるものと思われる。

結 論

モノクローナル抗体 Ki-67 を用いて、末梢血リンパ球、リンパ組織における Ki-67 核抗原の発現状態を検討して以下の結果を得た。

1. Ki-67 核抗原陽性T細胞は、ウイルス感染症患者末梢血リンパ球中には著しく増加し、細菌感染症ではほとんど出現しないことから、臨床的にウイルス感染と細菌感染の鑑別に有用と考えられた。

2. Ki-67 核抗原の発現状態より、川崎病、特発性心筋炎(症)の病因がウイルスである可能性が示された。

3. 白血病などの特殊な病態を除くと、Ki-67 核抗原は、末梢血においては活性化T細胞に発現するものと考えられ、HLA-DR 抗原と並んで、in vivo におけるT細胞活性化の指標となり得るものであった。

4. B細胞はリンパ節、扁桃などのリンパ組織において活性化され、分化、成熟し末梢血中に存在するのに対して、T細胞は活性化され、分化、増殖の過程にある細胞が、末梢血中に存在する可能性が示された。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始研究の御指導と御高閣を賜りました恩師谷口昂教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、直接御指導頂きました宮脇利男先生、関秀俊先生、谷内江昭宏先生はじめ、終始研究に御協力頂きました小児科免疫グループの諸兄、並びに教室員の皆様に深謝いたします。さらに、貴重な材料を御提供頂きました第二外科学教室山口明夫先生、国立金沢病院耳鼻咽喉科の諸先生方に心から感謝いたします。

本研究の一部は文部省科学研究費「No. 62440043」, 「No. 61304045」に拠るものである。

なお、本論文の一部は、第15回日本臨床免疫学会総会(1987年)において発表した。

文 献

- 1) Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H. & Stein, H.: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer*, **31**, 13-20 (1983).
- 2) Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.-H., Schwab, U. & Stein, H.: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.*, **133**, 1710-1715 (1984).
- 3) Gerdes, J., Dallenbach, F. & Lennert, K.: Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematol. Oncol.*, **2**, 365-371 (1984).
- 4) Gerdes, J.: An immunohistological method for estimating cell growth fractions in rapid histopathological diagnosis during surgery. *Int. J. Cancer*, **35**, 169-171 (1985).
- 5) Burger, P. C., Shibata, T. & Kleihues, P.: The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: Application to surgical neuropathology. *Am. J. Surg. Pathol.*, **10**, 611-617 (1986).
- 6) Ko, H.-S., Fu, S. M., Winchester, R. J., Yu, D. T. Y. & Kunkel, H. G.: Ia determinants on stimulated human T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **150**, 246-255 (1979).
- 7) Indiveri, F., Wilson, B. S., Russo, C., Quaranta, V., Pellegrino, M. A. & Ferrone, S.: Ia-like antigens on human T lymphocytes: Relationship to other surface markers, role in mixed lymphocyte reactions, and structural profile. *J. Immunol.*, **125**, 2673-2678 (1980).
- 8) Sutherland, R., Delia, D., Schneider, C., Newman, R., Kemshead, J. & Greaves, M.: Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4515-4519 (1981).
- 9) Yokoi, T., Miyawaki, T., Yachie, A., Ohzeki, S. & Taniguchi, N.: Discrepancy in expression ability of Tac antigen and Ia determinants defined by monoclonal antibodies on activated or cultured cord blood T lymphocytes. *J. Immunol.*, **129**, 1441-1445 (1982).
- 10) Miyawaki, T., Yachie, A., Uwadana, N., Ohzeki, S., Nagaoki, T. & Taniguchi, N.: Functional significance of Tac antigen expressed on activated human T lymphocytes: Tac antigen interacts with T cell growth factor in cellular proliferation. *J. Immunol.*, **129**, 2474-2478 (1982).
- 11) Taniguchi, N., Miyawaki, T., Yachie, A., Ikuta, N. & Ohzeki, S.: Kinetics of expression of T-cell "activation" antigens on in vivo- and in vitro-stimulated T cells. *Diag. Immunol.*, **1**, 104-111 (1983).
- 12) 宮脇利男, 谷内江昭宏, 生田敬定, 大関重治, 谷口 昂: ヒトT細胞の Interleukin 2 レセプター (Tac 抗原) の解析. 最新免疫研究法, (林 秀男, 山村雄一編), 第1版, 208-219頁, 医学書院, 東京, 1988.

- 13) Mendelsohn, J., Skinner, S. A. & Kornfeld, S.: The rapid induction by phytohemagglutinin of increased α -aminoisobutyric acid uptake by lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, **50**, 818-826 (1971).
- 14) Madsen, M. & Johnsen, H. E.: A methodological study of E-rosette formation using AET-treated sheep red blood cells. *J. Immunol. Methods*, **27**, 61-74 (1979).
- 15) Cordell, J. L., Falini, B., Erber, W. N., Ghosh, A. K., Abdulaziz, Z., Macdonald, S., Pulford, K. A. F., Stein, H. & Mason, D. Y.: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP Complexes). *J. Histochem. Cytochem.*, **32**, 219-229 (1984).
- 16) Hsu, S.-M., Raine, L. & Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 577-580 (1981).
- 17) Hsu, S.-M., Raine, L. & Fanger, H.: The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *Am. J. Clin. Pathol.*, **75**, 816-821 (1981).
- 18) Sternberger, L. A., Hardy Jr, P. H., Cuculis, J. J. & Meyer, H. G.: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, **18**, 315-333 (1970).
- 19) Schwarting, R., Gerdes, J., Niehus, J., Jaeschke, L. & Stein, H.: Determination of the growth fraction in cell suspensions by flow cytometry using the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol. Methods*, **90**, 65-70 (1986).
- 20) Palutke, M., Kukuruga, D. & Tabaczka, P.: A flow cytometric method for measuring lymphocyte proliferation directly from tissue culture plates using Ki-67 and propidium iodide. *J. Immunol. Methods*, **105**, 97-105 (1987).
- 21) Waele, M. D., Thielemans, C. & Van Camp, B. K. G.: Characterization of immunoregulatory T cells in EBV-induced infectious mononucleosis by monoclonal antibodies. *N. Engl. J. Med.*, **304**, 460-462 (1981).
- 22) 谷内江昭宏, 大関重治, 宮脇利男, 谷口 昂, 奥田則彦, 大木徹郎, 向井幹夫, 西川二郎, 加藤貞人: モノクローナル抗体を用いた伝染性単核症におけるT細胞サブセットの検討. *日児会誌*, **86**, 1996-2003 (1982).
- 23) Shulman, S. T. & Rowley, A. H.: Does Kawasaki disease have a retroviral aetiology? *Lancet*, **2**, 545-546 (1986).
- 24) Burns, J. C., Geha, R. S., Schneeberger, E. E., Newburger, J. W., Rosen, F. S., Glezen, L. S., Huang, A. S., Natale J. & Leung, D. Y. M.: Polymerase activity in lymphocyte culture supernatants from patients with Kawasaki disease. *Nature*, **323**, 814-816 (1986).
- 25) Kikuta, H., Mizuno, F. & Osato, T.: Kawasaki disease and an unusual primary infection with Epstein-Barr virus. *Pediatrics*, **73**, 413-414 (1984).
- 26) Leung, D. Y. M., Siegel, R. L., Grady, S., Krensky, A., Meade, R., Reinherz, E. L. & Geha, R. S.: Immunoregulatory abnormalities in mucocutaneous lymph node syndrome. *Clin. Immun. Immunopath.*, **23**, 100-112 (1982).
- 27) Leung, D. Y. M., Chu, E. T., Wood, N., Grady, S., Meade, R. & Geha, R. S.: Immunoregulatory T cell abnormalities in mucocutaneous lymph node syndrome. *J. Immunol.*, **130**, 2002-2004 (1983).
- 28) Matzinger, P.: A one-receptor view of T-cell behaviour. *Nature*, **292**, 497-501 (1981).
- 29) Kaufman, J. F., Auffray, C., Korman, A. J., Shackelford, D. A. & Strominger, J.: The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell*, **36**, 1-13 (1984).
- 30) Hsu, S.-M., Cossman, J. & Jaffe, E. S.: Lymphocyte subsets in normal human lymphoid tissues. *Am. J. Clin. Pathol.*, **80**, 21-30 (1983).
- 31) 内田俊和, 團 茂樹, 沢田海彦: リンパ節のB細胞, T細胞-組織切片を用いて - . *Immunohaematology*, **7**, 199-203 (1985).
- 32) Reinherz, E. L., Haynes, B. F., Nadler, L. M. & Bernstein, I. D.: Human B lymphocytes.

Leukocyte Typing II, 2, p3-43, Springer-Verlag, New York, 1986.

33) Miyachi, K., Fritzler, M. J. & Tan, E. M.: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.*, **121**, 2228-2234 (1978).

34) Mathews, M. B., Bernstein, R. M., Franza Jr, B. R. & Garrels, J. I.: Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*, **309**, 374-376 (1984).

35) Ogata, K., Ogata, Y., Nakamura, R. M. &

Tan, E. M.: Purification and N-terminal amino acid sequence of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin and development of ELISA for anti-PCNA antibodies. *J. Immunol.*, **135**, 2623-2627 (1985).

36) Ogata, K., Kurki, P., Celis, J. E., Nakamura, R. M. & Tan, E. M.: Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated with DNA replication. *Exp. Cell Res.*, **168**, 475-486 (1987).

Immunohistologic Characterization and Clinical Assessment of Activated Lymphocytes Expressing a Nuclear Antigen Reactive with "Ki-67" Monoclonal Antibody in the Peripheral Blood and Lymphoid Tissues Norisada Ikuta, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **97**, 594—607 (1988)

Key words: nuclear proliferation antigen, Ki-67 monoclonal antibody, double immunohistochemical staining, activated T-cell, viral infection

Abstract

A monoclonal antibody, Ki-67, recognizes a nuclear proliferation antigen which appears in all but the G₀ phase of proliferating human cells. In the present study, the immunohistochemical staining of various lymphoid cells with the Ki-67 antibody was performed to ask whether expression of Ki-67 nuclear antigen could be a reliable marker of lymphocyte activation in vivo. Only a very low percentage of peripheral blood lymphocytes from healthy individuals were shown to express the nuclear antigen identified by Ki-67 antibody. In contrast, the majority of lymphocytes stimulated with mitogens in vitro expressed strongly this nuclear antigen. Characteristically, in the acute stage of common viral diseases, such as infectious mononucleosis, measles, mumps and varicella, substantial proportions of circulating lymphocytes were shown to express Ki-67-reactive antigen in their nuclei. Double immunostaining techniques indicated that these Ki-67-positive cells had the surface phenotypes of T cells, but not of B cells, and coexpressed CD4 (helper/inducer subset) or CD8 (suppressor/cytotoxic subset) antigens on their surfaces. For example, Ki-67 nuclear antigen was found in 1/3 to 1/2 of circulating lymphocytes from patients in the acute stage of infectious mononucleosis and subsequently disappeared during convalescence. Almost all Ki-67-positive cells in this disorder showed the CD8⁺ surface phenotype, while in the other viral diseases, Ki-67-positive cells distributed in both CD4⁺ and CD8⁺ subsets at various proportions. These Ki-67-positive cells appeared to be larger in cell size than the other lymphocytes. In contrast, there was no significant appearance of Ki-67-positive lymphocytes in the blood of patients with bacterial infections such as septic meningitis, osteomyelitis and whooping cough, in which cell-mediated immunity does not play a central role for eradication of invading organisms. On the other hand, a significant increase of Ki-67-positive cells during the acute phase of

mycoplasma pneumoniae was observed, suggesting that the immune response in this disorder might be operating in a similar manner to that of viral infections. Of particular interest is the fact that an appreciable and prolonged increase of circulating Ki-67-positive cells was present in Kawasaki disease and in idiopathic myocarditis, which might imply possible pathogenic mechanisms in these disorders of yet unknown etiology. Usually, in lymph nodes, tonsils and spleens, many cells in the germinal centers of secondary follicles, so-called B-cell dependent area, were reactive with Ki-67 antibody, but only small numbers of Ki-67-positive cells were seen in the T-cell dependent area. These results suggested that proliferating B cells are largely localized in the lymphoid organs and hardly circulate in the peripheral pool, whereas some activated T cells which may be triggered by certain stimuli, particularly of viral and related agents are able to appear in the circulation. An increase of circulating Ki-67-positive cells in viral or related disorders but not in bacterial infections might be a useful clinical parameter for the discrimination between viral and bacterial infections.