Studies on Immunological Reconstitution after Bone Marrow Transplantation （Ⅱ）

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/2297/7704

金沢大学十全医学会雑誌 第93巻 第1号 46−57 (1984)

骨髄移植後の免疫学的検討 (II)

移植後早期の MLC 低反応性に関与する suppressor cells の検討

金沢大学医学部内科学第三講座（主任：服部絢一教授）
上 田 幹 夫

(昭和59年1月19日受付)

同種および自家骨髄移植後早期における，リンパ球混合培養 (mixed lymphocyte culture, 以下 MLC と略) 低反応性の原因として，非特異的 suppressor cells が関与する可能性について検討を行った．MLC は，5×10^4個の末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells, 以下 PBMC と略) を stimulator および responder cells とした2way MLC を用い，この MLC の系に3種の細胞濃度 (responder：modulator 比；1：0.25, 1：0.5&1：1) の modulator cells を添加し，その suppressor 活性を評価した．まず，modulator cells を全く加えない患者の two way MLC 反応性は control とした正常人の MLC 反応性の平均24%と，著明な低反応性を示した．control MLC に正常人の第三者の PBMC を modulator cells として添加すると，MLC 反応性は非添加の場合に比べてさらに増強したが，移植後早期の患者 PBMC を添加すると MLC 反応性は著明な抑制を受けて，1：1の添加では control MLC の32%にまで抑制がみられ，添加した患者 PBMC は suppressor cells としての作用を示した．そこで，この移植患者 PBMC 中に認められた suppressor cells の免疫学的特徴を明らかにするために種々の検討を行った結果，骨髄移植後早期に出現する MLC-suppressor cells は，1）羊赤血球とロゼットを形成するT細胞分画に認められ，2）T細胞分化抗原に対するモノクロール抗体で処理すると，OKT8 および OKIa1 との処理で suppressor 活性は消失し，3）3,000 rad X線照射によって suppressor 活性は影響を受けず，4）suppressor 活性の発現に responder cells と modulator cells は組織適合性の一致を必要とせず，さらに細胞傷害に基づく抑制ではない，ということが明らかとなった．つぎに，これらの特徴を有する suppressor cells の活性と患者リンパ球の two way MLC 反応性および骨髄移植後の時期との関係を検討した．suppressor cells と MLC 反応性との間には強い ($p<0.001$) 逆相関が認められ，MLC 反応性が control の約80%にまで回復していれば suppressor 活性はほぼ消失していることが示された．また，この suppressor 活性は骨髄移植後の時間経過とともに減弱し，移植後200日から1年の間にほぼ消失することも明らかとなった．以上の成績と，前回の検討で明らかとなった『骨髄移植後1年以内に one way MLC 反応性は正常化する』という成績とを考えあわせると，移植後早期の MLC 低反応性の理由のひとつとして，OKT8 陽性，OKIa1 陽性でX線抵抗性を有するT細胞が非特異的 suppressor cells として関与している可能性が示唆され，その suppressor cells が移植後200日から1年の間に消失する結果として，MLC 反応性が正常に回復するものと考えられた．

Key words Bone marrow transplantation, Mixed lymphocyte culture, Suppressor cell

Studies on Immunological Reconstitution after Bone Marrow Transplantation [II] : The Role of MLC-suppressor cells on Low MLC Reactivity in Early Posttransplant Patients, **Mikio Ueda**, Depertment of Internal Medicine III (Director : Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920.

白血病や再生不良性貧血などの有力な治療法としての骨髄移植は，その方法がほぼ確立されてきており，好成績が多数報告[1)~4)]されるにいたっている．しかし，移植前処置として白血病細胞除去や移植片拒絶予防を目的とし，大量の抗腫瘍剤や全身X線照射（total body irradiation，以下TBIと略）が施行されるために，患者自身の造血系細胞や免疫担当細胞はほぼ完全に破壊される．そのために，移植後の血液学的および免疫学的回復は，移植されたドナー由来の造血幹細胞の分化，増殖にゆだねられるが，血液学的回復に比べ免疫学的回復が非常に遅延することが知られている．免疫学的回復の遅延すなわち免疫不全状態の持続のためにウイルス，細菌および真菌などによる日和見感染が重大な問題となり，とくにcytomegalo virus（以下CMVと略）による間質性肺炎はしばしば致死的となりうるため移植患者の予後を左右する重要な因子となっている[2)4)]．自家骨髄移植に比べ同種骨髄移植の場合，免疫学的回復が遅く不完全で[5)6)]，しかもgraft-versus-host disease（GVHD）を合併した例ではその傾向がさらに促進されるので[7)~9)]，日和見感染の危険性はさらに高まることが指摘されている．骨髄移植後の免疫学的再構築については，末梢血リンパ球[7)]およびT-cellサブセット[10)11)]，リンパ球幼若化反応[5)7)]，in vitro免疫グロブリン産生[11)12)]，リンパ球細胞傷害検査[13)]，遅延型皮フ反応[5)7)]などについておもに同種骨髄移植患者において検討されているが，液性免疫より細胞性免疫の回復の方がより遅れる[7)]とされている．しかしその免疫学的反応性の低下を来たすメカニズムを明らかにしたものは少ない[6)11)]ようである．移植後免疫能の低下を把握し，そのメカニズムを明らかにすることは，移植後免疫不全状態の解明に重要と考えられる．

本研究では，骨髄移植後早期で免疫学的回復が不完全と予想される患者を対象として，(mixed lymphocyte culture，以下MLCと略）反応性の低下に関与しうるsuppressor cellsについて検討を行い，興味ある成績を得たので報告する．

対象および方法

I．対　象

1980年より1983年までの間，金沢大学第三内科で実施した同種骨髄移植（allogeneic bone marrow transplantation，以下allo-BMTと略）患者7例，自家骨髄移植（autologous bone marrow transplantation，以下auto-BMTと略）患者3例を対象とした．移植は

Table 1. Patient characteristics

No.	Age	Sex	Diagnosis* (stage at BMT)	GVHD** Acute	GVHD** Chronic	Sampling date*** Posttransplant(wk)						
Allogeneic												
1	18	M	ALL (1st CR)	–	–	100						
2	46	M	AML (1st CR)	–	–	52	67	76				
3	13	F	ALL (2nd CR)	II	–	31	32	36	47	49	51	
4	20	F	ALL (3rd CR)	–	–	9	10	19	21	23	26	32
5	26	F	AML (1st CR)	Ⅳ	N.E.	3	4	5				
6	33	F	CML (Chronic[)	–	N.E.	4	5	6				
7	31	F	APL (2nd CR)	–	active	4	6	11	16			
Autologous												
8	52	M	NHL (III)	–	–	136						
9	23	M	NHL (III)	–	–	3	4	5				
10	50	M	NHL (III)	–	–	3	7	12				

* BMT, bone marrow transplantation; ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myelogenous leukemia; CML, chronic myelogenous leukemia; APL, acute promyelocytic leukemia; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; CR, complete remission.
** GVHD, graft-versus-host disease; N.E., not evaluable.
*** wk, week.

既に報告した方法によって実施した．その概略はすでに前報で述べたので省略する．Table 1は対象とした移植患者の臨床的特徴を示したものである．allo-BMTの患者の年齢は13歳から46歳(中央値26歳)までであった．移植前の基礎疾患は，急性リンパ性白血病（acute lymphoblastic leukemia, ALL）3例，急性骨髄性白血病（acute myelogenous leukemia, AML）2例，急性前骨髄球性白血病(acute promyelocytic leukemia, APL）1例および慢性骨髄性白血病（chronic myelogenous leukemia, CML）1例の計7例であった．このうち2例に急性GVHD，1例に慢性GVHDが見られた．免疫学的検索は移植後第3週から第100週の間に行った．auto-BMT患者は，23歳から52歳(中央値50歳)までであった．allo-BMTの患者は全例移植後第15週までGVHD予防のため1回量15～10 mg/dayのメソトレキセート（methotrexate)の予防投与をうけた．比較検討のためのコントロールには，ほぼ同じ年齢層の健康成人を無作為に選んだ．

II．末梢血単核球分離

末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cells, 以下PBMCと略)はすでに述べたように，Ficoll-Hypaque比重遠心法により分離採取した．RPMI 1640培養液で3回洗浄後，15%ヒトプール血清（human pooled serum, 以下HPSと略）を加えたRPMI 1640培養液に5×10^5/mlの濃度となるように調整し，以下の実験に用いた．

III．T-cellとnon-T cellの分離

前述の方法で得られたPBMCを牛胎児血清中（fetal calf serum, 以下FCSと略）に5×10^6/ml濃度で浮遊させたものに20倍の細胞濃度（1×10^8/ml)のノイラミニダーゼ（Behringwerke A G, W. Germany）処理羊赤血球（以下SRBCと略）を等量混合し，再びFicoll-Hypaqueに重層し4°C, 400 Gで30分間遠心分離した．Ficoll-Hypaque上層のSRBCとロゼット（以下Eロゼットと略）を形成しない細胞をnon-T cellとして採取し，これをRPMI 1640培養液で3回洗浄した．Eロゼット形成細胞を含むpelletは，tris-NH_4Cl bufferを用いてSRBCを溶血させた後，RPMI 1640培養液で3回洗浄しT-cellとした．T-cell中のEロゼット形成細胞は92%～97%で，一方non-T cellの42%～65%は表面免疫グロブリン陽性細胞であり，Eロゼット形成細胞の混入は5%以下であった．また，dye exclusion testによるT-cell, non-T cellのviabilityは97%以上であった．

IV．モノクロナール抗体による処理

T-cell分化抗原に特異的なモノクロナール抗体OKT 4, OKT 8およびOKIa 1（Ortho Diagnostic System, Ralitan, U. S. A.）とウサギ補体（Behringwerk AG,）でPBMCを処理し，各抗体陽性細胞を除去するnegative selectionを行った．まず，RPMI 1640培養液中に1×10^7/mlの濃度に調整したPBMCに，モノクロナール抗体を1/40～1/20量加え4°Cで30分間反応させ，さらにウサギ補体を最終濃度1：6となるように加え，37°Cで30分反応させた．反応終了後RPMI 1640培養液で3回洗浄，細胞濃度の再調整は行わずに，モノクロナール抗体処理前と等量の15%HPS加RPMI 1640培養液を加え，処理細胞を再浮遊させ

Table 2. Culture setup in triplicate.

Culture	Responder* cells	Stimulator** cells	Modulator** cells
Control MLC	N_1	N_2	
Control MLC+normal	N_1	N_2	N_3
Patient MLC	P	N_1 or N_2	
Test 1	N_1	N_2	P
Test 2	N_1	N_2	P_T
Test 3	N_1	N_2	P_{nonT}
Test 4	N_1	N_2	P_{T4}^-
Test 5	N_1	N_2	P_{T8}^-
Test 6	N_1	N_2	P_{Ial}^-
Test 7	N_1	N_2	P_X

* N_1 and N_2, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from normal individuals; P, PBMC from patients.
** N_3, PBMC from normal individuals different from N_1 and N_2; P_T, T-cells of patient's PBMC; P_{noT}, non-T cells of patient's PBMC; P_{T4}^-, Patient's PBMC depleted of OKT4-positive cells; P_{T8}^-, Patient's PBMC depleted of OKT8-positive cells; P_{Ial}^-, Patient's PBMC depleted of OKIal-positive cells; P_X, Patient's PBMC after 3,000 rad radiation.

た．OKT 4 と補体で処理した細胞分画を OKT 4^-分画とすると，この分画における OKT 4 陽性細胞（以下 OKT 4^+細胞と略）の混入率は 4%以下，OKT 8 と補体による処理後の細胞分画（以下 OKT 8^-分画と略）における OKT 8 陽性細胞（以下 OKT 8^+細胞と略）の混入率は 7 %以下，また OKIa 1 と補体による処理後の細胞分画（以下 OKIa 1^-分画と略）における OKIa 1 陽性細胞（以下 OKIa 1^+細胞と略）の混入率は 4 %～11%であった．dye exclusion test では，抗体処理後の細胞の viability はいずれの場合も 93%～97%であった．

V．リンパ球混合培養（MLC）

MLC は responder および stimulator cells として 5×10^5/ml の濃度の PBMC を 100 μl ずつ混合し，3 種類の細胞濃度（responder：modulator 比；1：0.25，1：0.5&1：1）の modulator cells を Table 2 で示す組み合わせで添加して行った．まず，正常人 N_1 と N_2の PBMC による 2 way MLC をコントロール（control MLC,）とし患者と比較検討のためにこの control MLC に第三者（N_3）PBMC を modulator cells として加えた組み合わせの培養も行った．patient MLC は control MLC に用いた正常人（N_1または N_2）と移植患者(P)との MLC とし，Test 1 は control MLC に患者 PBMC を modulator cells として加えたものとした．Test 2 以下の実験は，添加する modulator cells の特徴を明らかにするために行ったもので，Test 2 では modulator cell として患者 T-cell を，Test 3 では non-T cell を加えた，Test 4 では OKT 4^-分画を，Test 5 では OKT8^-分画を，Test 6 では OKIa 1^-分画を，Test 7 では 3,000 radX 線照射し

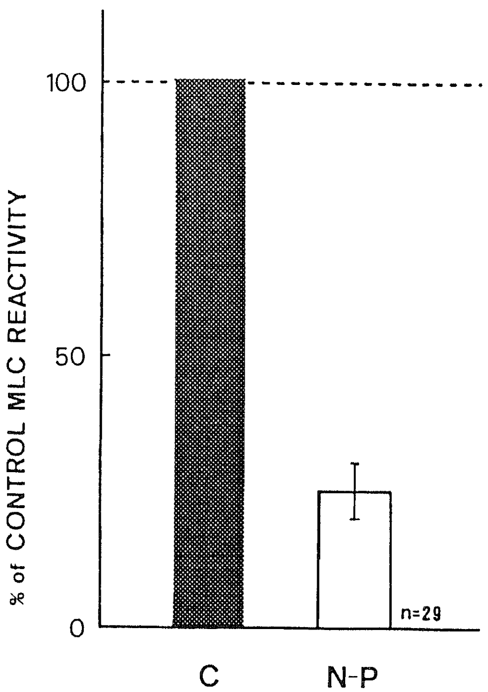

Fig. 1. Two-way MLC of normal PBMC (control MLC, C) and reactivity of two-way MLC between normal controls and transplant patients (patient MLC, N-P).
For two-way MLC, 5×10^4 PBMC from normal individuals and patients were cultured as responder and stimulator cells. A closed column represents the cotrol MLC which is shown to be 100% in reactivity. An open column represents the mean (M) % of control MLC with standard error of the mean (SEM) in 29 experiments.

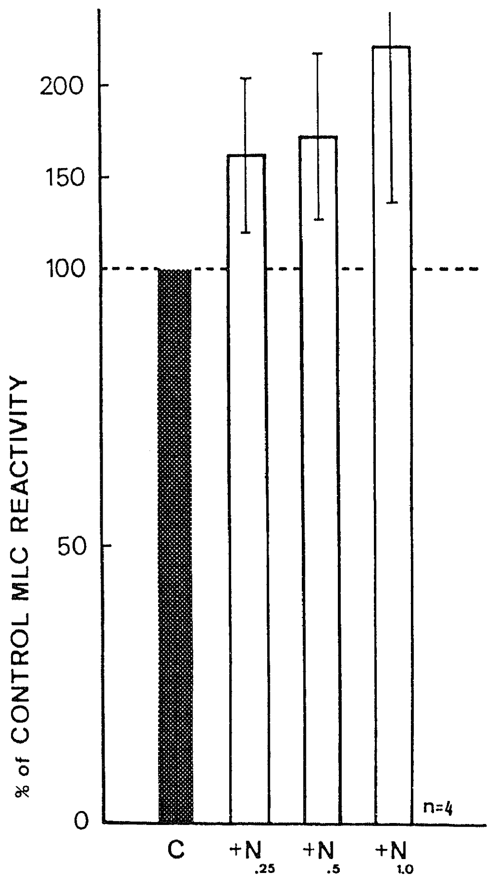

Fig. 2. The effects of addition of PBMC from normal individuals as modulator cells on reactivity of the control MLC.
Three concentrations, responder : modulator ratio=1 : 0.25 (+$N_{.25}$), 1 : 0.5 (+$N_{.5}$) & 1 : 1 (+$N_{1.0}$), of modulator cells were added to the control MLC. Each value represents M±SEM of % control in 4 experiments.

た患者PBMCを，それぞれmodulator cellsとして加えた．MLCは37℃，100%湿度，5%CO_2 in airという条件下で行い，microtiterplate (Nunclon, # 163320 Denmark)を用い，全てtriplicateで7日間培養した．培養終了10〜12時間前に1 μCiの^{3}H-thymidine（以下^{3}H-TdRと略，New England Nuclear, specific activity 5 ci/mM）を加え，multiple automatic cell harvester（ラボマッシュLM 101，ラボサイエンス）を用いて細胞を採集した後，液体シンチレーションカウンター（LSC-651，Aloka）で^{3}H-TdR uptakeを測定し，結果はcpmで示した．

VI．modulator cellsのMLC抑制効果測定

control MLCにおける^{3}H-TdR uptakeを100%とし，その他の組み合わせで行ったMLCの成績は，control MLCの値に対する百分比（%control）で示した．統計学的検討にはStudents' t-testを用い，$p<0.05$の場合を有意差ありとした．

成　　績

I．骨髄移植患者に認められたMLC反応性低下およびMLC-suppressor cells

Fig. 1は，正常人(N_1, N_2)によるcontrol MLCおよび正常人（N_1またはN_2）と患者（p）の組み合わせによるMLCの成績を示したものである．患者PBMCと正常人PBMCとのMLCはcontrol MLCに比べ有意（$p<0.01$）に低下しており，%controlの平均値は24%であった．患者（p）と正常人（N_1またはN_2）の組み合わせのちがい(P-N_1とP-N_2)によるMLC反応性への影響はほとんど認めなかった．Fig. 2はcontrol MLC（C）に正常第三者PBMC（N_3）をmodulator cellsとして種々の濃度で加えた場合の反応性の変化を示したものである．図から明らかなように，MLC反応性はdose dependentに増強し，responder cellsと同じ細胞濃度（1：1）のmodulator cellsを加えた場合には，%controlは221±86 (mean±1 SEM) %と有意（$p<0.01$）の増強を示した．正常人PBMCをmodulator cellsとして加えた場合には全てMLC反応性は増強し，%controlは104〜431%と大きなバラツキがみられたものの，抑制効果を示すことは全くなかった．Fig. 3は，control MLCと，患者PBMCをmodulator cellsとしてcontrol MLCに加えた場合の反応性を示したものである．図から明らかなように反

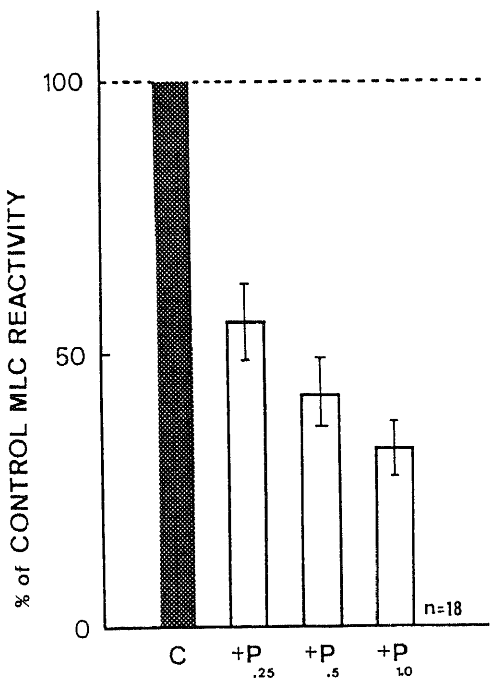

Fig. 3. The effects of addition of PBMC from patients as modulator cells (P) on reactivity of the control MLC.
See the legends in Fig. 1 and Fig. 2 as for the culture setup. Each value represents M±SEM of % control in 18 experiments.

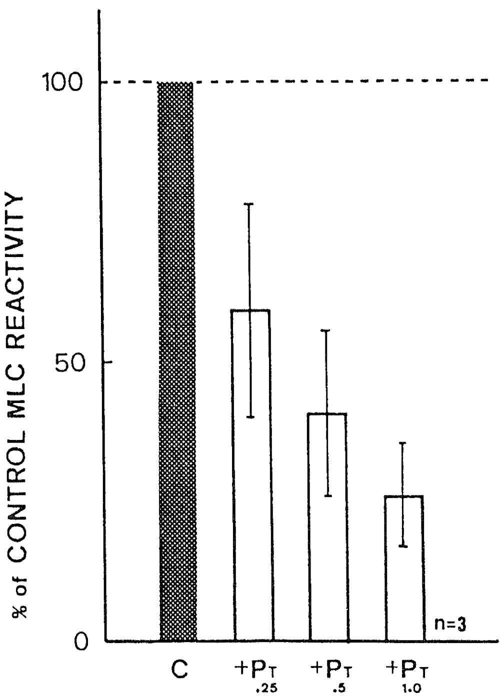

Fig. 4. The effects of addition of T-cells separated from patient's PBMC as modulator cells (P_T) on reactivity of the control MLC.
See the legends in Fig. 1 and Fig. 2 as for the culture setup. Each xalue represents M±SEM of % control in 3 experiments.

応性は dose dependent な抑制をうけ，%control は modulator cells 1.25×10^4 (1：0.25) 添加では平均55%，2.5×10^4(1：0.5)添加では 43%，5×10^4(1：1) 添加では 32%と有意 ($p<0.001$) な抑制が認められた．同じ患者の PBMC を，別の N_1-N_2の組み合わせの MLC に加えてみても同様に dose dependent な抑制が観察された．

MLC-suppressor cells の特徴

Fig. 4 は，control MLC と患者 T-cell を modulator cells としての添加した場合の MLC 反応性を示したものである．患者 PBMC を添加した時と同様に dose dependent な抑制を示し，その%control は (1：0.25) 濃度添加では 59%，(1：0.5) 濃度添加では 41%，(1：1) 濃度添加では 26%と有意 ($p<0.05$) な抑制を示した．Fig. 5 は，control MLC と患者 non-T cell を modulator cells として添加した場合の MLC 反応性を示したものである．図から明らかなように，種々の細胞濃度の non-T cell を加えてみても MLC 抑制は見られず，その%control は (1：0.25) 濃度添加で 84%，(1：0.5) 濃度添加で 85%，(1：1) 濃度添加で 91%といずれも有意の低下を示さなかった．Fig. 6 は，control MLC に OKT 4^-分画を modulator cells として加えた場合の MLC 反応性を示したものである．図から明らかなように，OKT 4^-分画細胞の添加で%control は (1：0.25) 濃度添加では平均 72% (1：0.5)濃度添加では平均 59%，(1：1) 濃度添加では平均 33%と，dose dependent な抑制がみられた．(1：1)濃度の OKT 4^-分画細胞の添加では MLC 反応性は有意 ($p<0.01$) に低下し，これは患者 PBMC あるいは T-cell を添加した場合とほぼ同程度の抑制であった．Fig. 7 は，control MLC に OKT 8$^-$分画細胞を modulator cells として加えた MLC 反応性を示したものである．%control は，modulator cells (1：0.25) 濃度添加では平均 89%，(1：0.5) 濃度添加では平均 97%，(1：1) 濃度添加では平均 90%と，MLC 反応性の有意な抑制は認められなかった．Fig. 8 は，control MLC に OKIa 1^-分画細胞を modulator cells として加えた MLC 反応性を示したものである．%control は，(1：0.25)濃度添加では平均 102%，(1：0.5) 濃度添加では平均 100%，(1：

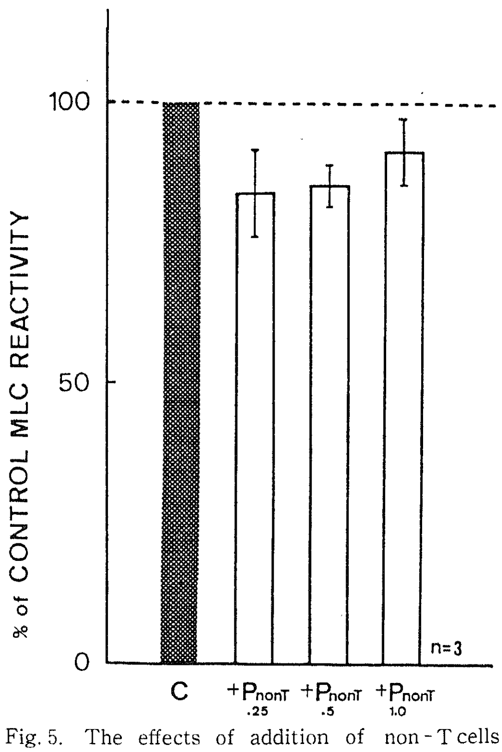

Fig. 5. The effects of addition of non-T cells seprated from patient's PBMC as modulator cells (P_{nonT}) on reactivity of the control MLC. See the legends in Fig. 1 and Fig. 2 as for the culture setup. Each value represents M±SEM of % control in 3 experiments.

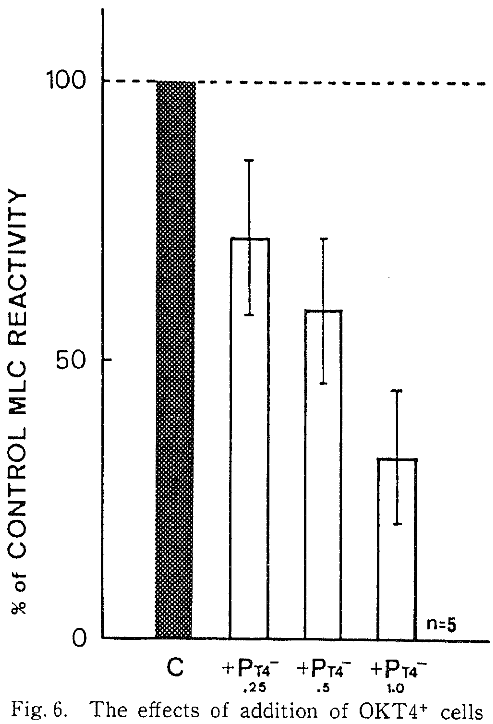

Fig. 6. The effects of addition of $OKT4^+$ cells depleted cells from patient's PBMC as modulator cells (P_{T4^-}) on reactivity of the control MLC. See the legends in Fig. 1 and Fig. 2 as for the culture setup. Each value represents M±SEM of % control in 5 experiments.

1）濃度添加では平均98%と，MLC反応性の抑制は全く認められなかった．Fig. 9は，control MLCに3,000 radのX線照射を行った患者PBMCをmodulator cellsとして添加したMLC反応性を示したものである．%controlは（1：0.25）濃度添加で51%，（1：0.5）濃度載加で38%，（1：1）濃度添加で27%と有意な（$p<0.001$）抑制を示し，その程度は患者PBMCを加えた場合（Fig. 3）と同じであり，X線照射は抑制効果に全く影響を与えなかった．以上を要約すると，MLC-suppressor cellsは，T-cellのうち，OKT 4^-分画すなわちOKT 8陽性細胞に富み，しかもOKIa 1陽性細胞に富む分画に属し，放射線抵抗性を有することが明らかとなった．

III．MLC-suppressor活性とMLC反応性および移植後の時期との関係

Fig.10は，MLC-suppressor活性とMLC反応性の相関関係を示したものである．図に示されるように，それら両者の間には有意（$p<0.001$）の逆相関（$\gamma=-0.855$）が認められ，統計学的にはMLC-suppressor cellsが消褪するにつれてMLC反応性はしだいに回復してゆき，suppressor活性が消失する時点で約80%の回復を示した．Fig.11は，MLC-suppressor活性と移植後の時期との関係を検討したものである．移植後100日までのsuppressor活性は%suppressionで示すと60.6±8.0（mean±1 SEM）%（$p<0.001$），100～200日のsuppressor活性は45.0±12.7%（$p<0.1$），200～365日のsuppressor活性は5.5±23.9%（$p<0.2$），365日以上では34.0±29.8%（$p<0.2$）となり移植後の時間の経過とともにsuppressor活性が消褪し，200～365日の間にほぼ消失することが明らかになった．しかし，少数例の検討ではあるが，大きなバラツキを認めるものの365日以後にsuppressor活性を再び示す例が観察された．以上の成績を要約すると，移植後100日まで有意のMLC-suppressor活性が認められ，この抑制はその後の時間経過とともに減弱傾向を示し，200～365日の間でほぼ消褪することが明らかとなった．また，このMLC-suppressor活性の時間的変化に対応してMLC反応が回復し，この抑制が消失する時期に一致してMLC反応性もほぼ正常域に回復することが示された．

考　　察

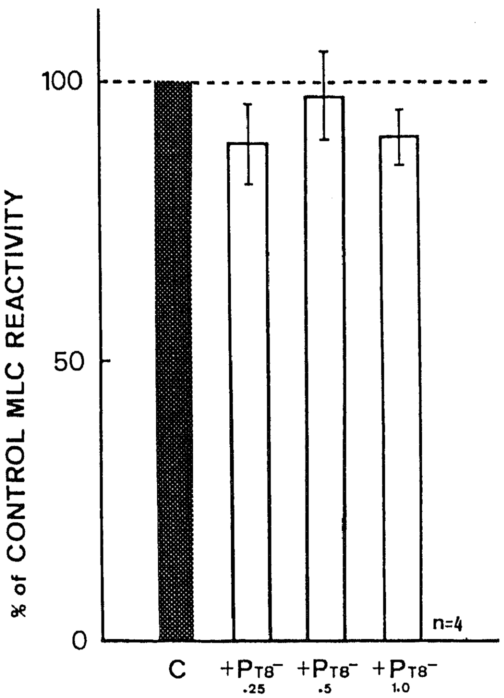

Fig. 7. The effects of addition of OKT8$^+$ cells depleted cells from patient's PBMC as modulator cells (P_{T8}^-) on reactivity of the control MLC. See the legends in Fig. 1 and Fig. 2 as for the culture setup. Each value represents M±SEM of % control in 4 experiments.

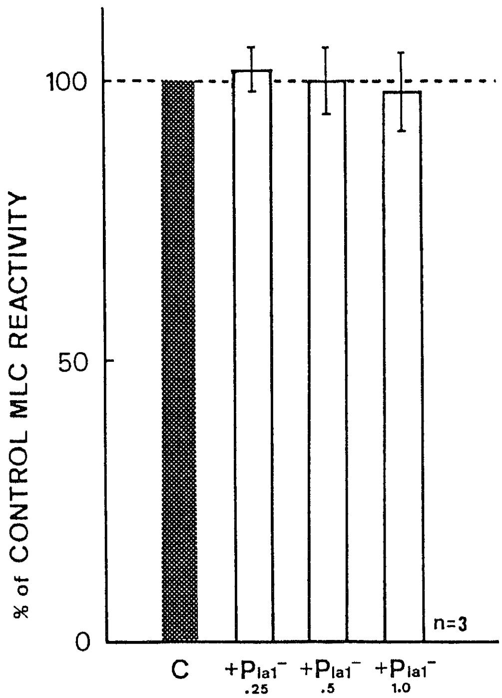

Fig. 8. The effects of addition of OKIa1$^+$ cells depleted cells from patient's PBMC as modulator cells (P_{Ia1}^-) on reactivity of the control MLC. See the legends in Fig. 1 andFig. 2 as for the culture tetup. Each value represents M±SEM of % control in 3 experiments.

同種骨髄移植では，移植片拒絶予防や種瘍細胞根絶を目的として，"marrow-lethal"な化学放射療法が移植前処置として実施されるために，移植後は骨髄は無形成となり，造血系細胞だけでなくリンパ系細胞も循環血液中でほぼnadirの状態となる．そのため，marrow rescueを目的としてHLAの一致した同胞から骨髄細胞が移植され，造血の再構築が計られるわけであるが，血液学的回復は比的早期に得られしかもほぼ完全であるのに対し，免疫学的回復は大幅に遅延し，しかもきわめて不完全であることが指摘されている[4)~7)]．このような同種骨髄移植後長期にわたって持続する免疫不全状態については，これまで多くの免疫学的検討がなされてきている．たとえばin vivoでの検索では，血清免疫グロブリン値はIgAを除き3カ月以内に回復する[7)]のに対し，pneumococcal antigenに対する特異的抗体産生の回復には1年ないし2年を要するという成績が報告[16)]されている．遅延型過敏反応の正常化にはさらに長期間を必要とし，dinitrochlorobenzen (DNCB) による皮膚反応の回復は2年以上，recall antigenに対する反応では4年以上要したという[17)]．また，in vitroでの検索では，mitogenを用い

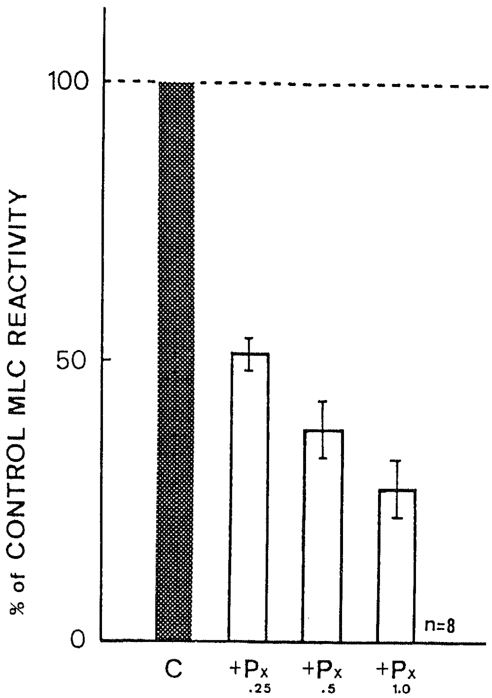

Fig. 9. The effects of addition of patient's PBMC irradiated by 3,000 rad as modulator cells (P_X) on reactivity of the control MLC.
See the legends in Fig. 1 and Fig. 2 as for the culture setup. Each value represents M±SEM of % control in 8 experiments.

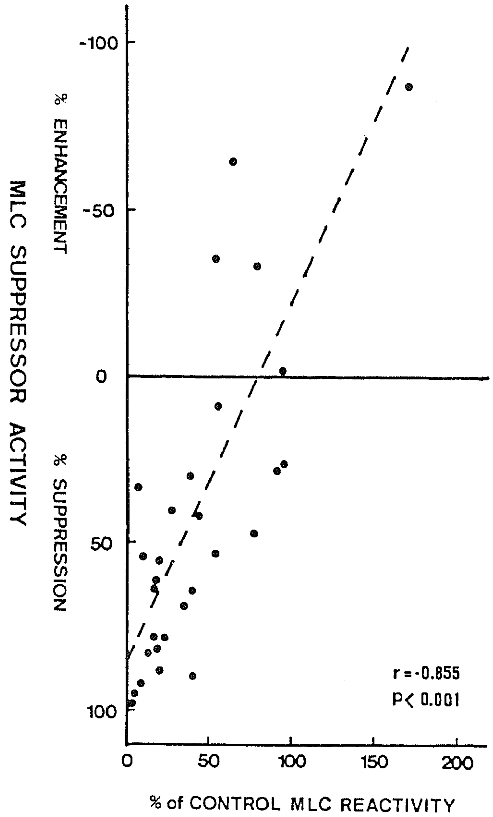

Fig. 10 Relationship of MLC-suppressor activity to % of control MLC reactivity.

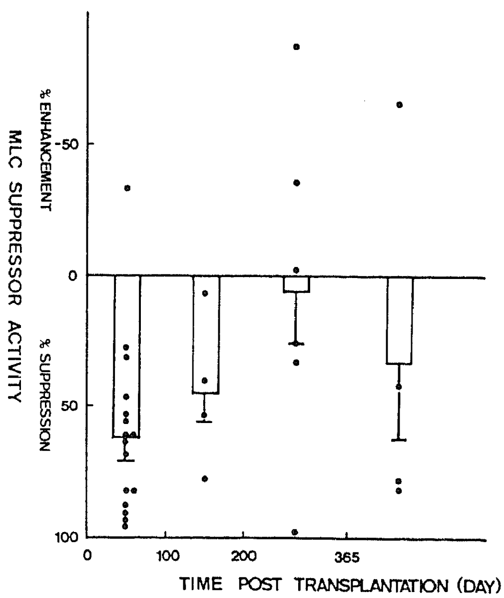

Fig. 11. Sequential changes in MLC-suppressor activity in posttransplant days.

た polyclonal activation による免疫グロブリン産生系の検討がよくなされている．Witherspoon ら[18]は，移植後3カ月間の早期例における観察では，約半数の例に正常リンパ球による免疫グロブリン産生を抑制する T-cell を認めており，in vitro 抗体産生系におけるこの抑制性 T-cell の特徴については，本研究での MLC-suppressor cells との異同と関係し興味が持たれるが，X線感受性を有するという点で異なる population であると考えられる．さらに Lum ら[11]は，3カ月以上の長期生存例ではこの機能的異常の出現頻度は減少するものの，GVHD を合併することにより in vitro 免疫グロブリン産生能は再び低下し，その原因として OKT 8^+細胞に強い免疫グロブリン産生抑制作用を認めたのに加え，OKT 4^+細胞でも正常 OKT 4^+細胞の持つ免疫グロブリン産生増強作用が欠損していたり，中には逆に OKT 4^+細胞に抑制機能を認める例が1/3の症例に認められたとつけ加えている．つまり，in vitro 免疫グロブリン産生系における調節性 T-cell の phenotype は，骨髄移植後の患者では従来いわれているものとは異なっており，heterogenous な機能的 T-cell サブセットが存在するものと予想される．次に，mitogen や同種抗原に対するリンパ球の増殖性反応でも，in vitro 免疫グロブリン産生系と同様に，移植後3カ月頃までは^{3}H-TdR 摂取の著明な低下を示すが，大多数の患者では1年以内にほぼ正常範囲内に回復することが明らかにされている[7]．Tsoi ら[19]は，活動性慢性 GVHD を合併した患者末梢血中に同種抗原に対する donor リンパ球の MLC 反応性を非特異的に抑制する non-specific suppressor cells の存在を報告している．しかもこの non-specific suppressor cells の存在と varicella zoster virus 感染症とは関係が深く，免疫不全の一原因となっている可能性を強く示唆している．この non-specific suppressor cells の特徴は，少数例の観察ではあるが OKT 8^+の T-cell であり，1,600 rad の X 線照射に対し感受性を認めているが，稀に monocyte にも non-specific suppressor cells としての機能を認めている．この non-specific suppressor cells は移植後早期例にはほとんど認められていないこと，X線感受性が認められたことにより，本研究における MLC-suppressor cells とは異なる population に属するものと予想される．さらに Tsoi ら[20]は，安定したキメリズムが得られ免疫学的回復を認める長期生存例に，trinitrophenyl (TNP) で修飾した host 細胞を刺激細胞とした donor 細胞の反応性のみを特異的に抑制する specific suppressor cells を見出しており，免疫学的寛容状態の説明に用いている．この寛容維持に関与していると思われる specific suppressor cells も OKT 8^+の T-cell で X 線感受性があり，表面抗原や X 線感受性だけでは先の non-specific suppressor cells とは区別できず，表面抗原からの検討のみならず機能面からの検討が必要かつ重要であると思われる．当移植チームでも移植後の免疫学的再構築の状況を検討し，免疫不全状態が持続する原因やメカニズムを明らかにするために，種々の免疫学的解析を行ってきた．その中で当教室末永ら[21]は，移植後120日以上生存し MLC 反応性および phytohemagglutinin (PHA) 反応性の低下している症例に，それぞれ異なる population に属する suppressor cells を報告している．すなわち，骨髄 donor の PHA 反応性を抑制する X 線感受性の suppressor cells と，骨髄 donor を responder cells とした MLC 反応性を抑制する X 線抵抗性の suppressor cells を認め，後者は non-T cell 分画であったという．この donor の MLC 反応性を抑制する suppressor cells は，X 線抵抗性ではあるが本研究で明らかとなった MLC-suppressor cells とは異なるところの non-T cell 分画に属し，Tsoi ら[19]のいう GVHD 患者中に認められた non-specific suppressor cells の一部が monocyte であったという報告に一致する成績と考えられる．以上，ヒト骨髄移植後の免疫不全状態および寛容維持の免疫学的メカニズムの説明として，suppressor cells の役割りを強調したものが多いが，検討の方法や検討を加えた症例の移植後の時期や GVHD の有無などにより，それら suppressor cells の表面マーカーや X 線感受性については強い heterogeneity がある．Tutschka ら[22]は，ラットを用いた骨髄移植において，移植後40日目頃より異なる同種抗原を stimulator とし骨髄 donor 細胞を responder とする MLC に対し非特異的に抑制する suppressor cells が出現することを認め，この非特異的 suppressor cells は GVHD の消褪とともにしだいに減少してゆき，かわって250日目頃より，host 抗原に対する骨髄 donor 細胞の反応のみを特異的に抑制する suppressor cells が出現し，約2年目頃にこの suppressor cells が認められなくなることを報告している．この報告では，検討方法が Tsoi ら[19)20]の方法と類似しており，non-specific と specific の2種類の suppressor cells を認める点でも類似していると思われるが，移植後早期より non specific suppressor cells が出現し，しかも時間の経過に伴い消褪していくという点では，むしろ本研究での MLC-suppressor cells と類似していると思われる．いずれにせよ，ラットでも移植後の時期により suppressor cells に heterogeneity が見られたことは，先に述べたヒトでの成績と符合し興味深い．移植後早期の患者や GVHD

を合併している患者において免疫反応を非特異的に抑制する suppressor cells は，移植前処置として行われた全身X線照射によって直接的に，またGVHD合併例ではその標的臓器として host の胸腺ーリンパ組織が破壊された結果，免疫担当細胞の分化成熟障害が惹起されたり，また生体内での non-HLA 抗原刺激による活性化などによって生ずることが考えられる．本研究では，non-HLA 抗原刺激による活性化やGVHDとは関係のない auto-BMT 例でも，この非特異的 MLC-suppressor cells が出現しており，移植前処置として用いる全身X線照射の影響が大きいものと考えられる．本研究における MLC-suppressor cells の作用機序については，現在検討をすすめているが，その preliminary data では細胞傷害に基づく抑制でもなく，活性化された MLC-suppressor cells が Interlukin 2（以下 IL-2 と略）を吸収することによる抑制でもないことを確認している．ごく最近，Azogui ら[23]は，allo-BMT 後早期の患者において IL-2 産生能の低下を認め，それにX線感受性を示す suppressor cells の関与を報告している．今回対象とした患者の多くに IL-2 産生能の低下を認めており，また外来性の IL-2 を加えることにより全例に MLC 反応性の回復が得られていることにより，本研究における MLC-suppressor cells が IL-2 産生の抑制を介して MLC 反応性の抑制を示している可能性も考えられると思われる．この MLC-suppressor cells の詳細な抑制メカニズムは不明であり，今後の検討が必要であると思われる．

結　　論

1．同種および自家骨髄移植後早期（1年以内）の患者では，正常人 PBMC との 2 way MLC において著明な低反応性を認めた．これらの患者 PBMC 中に HLA に関して非特異的な MLC-suppressor cells を認め，これが MLC 低反応性の一因と考えられた．

2．移植後早期患者に認められた MLC-suppressor cells は OKT 8^+, OKIa 1^+ の T-cell でX線抵抗性であった．preliminary data では，この抑制は細胞傷害に基づくものでも，IL-2 吸収に基づくものでもないと考えられた．

3．この MLC suppressor cells は移植後経時的に消褪し，約200日目頃から1年目頃までの間に消失し，それと平行し MLC 反応性が回復することが予想された．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜った恩師服部絢一教授に深甚の謝意を表します．また直接御指導，御援助を載いた原田実根博士ならびに多大な協力を載いた金沢大学第三内科学教室の諸先生および3病棟3階の看護婦さんに深く感謝いたします．

文　　献

1) **Thomas, E. D., Buckner, C. D., Clift, R. A., Fefer, A., Johnson, F. L., Neiman, P. E., Sale, G. E., Sanders, J. E., Singer, J. W., Shulman, H., Storb, R. & Weiden, P. L.**: Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission. N. Engl. J. Med., **301**, 597-599 (1979).

2) **Bortin, M. M., Gale, R. P. & Rimm, A. A.**: Allogeneic bone marrow transplantation for 144 patients with severe aplastic anemia. JAMA, **245**, 1132-1139 (1981).

3) **Gale, R. P., Kay, H. E. M., Rimm, A. A. & Bortin, M. M.**: Bone-marrow transplantation for acute leukemia in first remisson. Lancet, **2**, 1006-1008 (1982).

4) **Thomas, E. D.**: Marrow transplantation for malignant disease. J. Clin. Oncol., **1**, 517-531 (1983).

5) **Shiobara, S., Harada, M., Mori, T., Kodo, H., Ishino, C., Matsue, K., Odaka, K., Kondo, K. & Hattori, K.**: Difference in posttransplant recovery of immune reactivity between allogeneic and autologous bone marrow transplantation. Transplant. Proc., **14**, 429-433 (1982).

6) **Ueda, M., Harada, M., Shiobara, S., Nakao, S., Kondo, K., Odaka, K., Matsue, K., Mori, T. & Hattori, K.**: T lymphocyte reconstitution in long-term survivors after allogenic and ausologous marrow transplantation. Transplantation, in press.

7) **Noel, D. R., Witherspoon, R. P., Storb, R., Atkinson, K., Doney, K., Mickelson, E. M., Ochs, H. D., Warren, R. P., Weiden, P. L. & Thomas, E. D.**: Does graft-versus-host disease influence the termpo of immunologic recovery after allogeneic human marrow transplantation? An observation of 56 long-term survivors. Blood, **51**, 1087-1105 (1978).

8) **Witherspoon, R., Noel, D., Storb, R., Ochs, H. D. & Thomas, E. D.**: The effect of graft-versus-host disease on reconstitution of the immune system following marrow transplantation for aplastic anemia or leukemia. Transplant. Proc., **10**, 233-235 (1978).

9) **Saxon, A., McIntyre, R. E., Stevens, R. H. & Gale, R. P.**: Lymphocyte dysfunction in chronic

graft-versus-host disease. Blood, **58**, 746-751 (1981).
10) **Bruin, H. G., Astaldi, A., Lupers, T., Griend, R. J., Dorren, L. J., Schellekens, P. A., Tanke, H. J., Rose, M. & Vossen, J. M.** : T-lymphocyte characteristics in bone marrow-transplanted patients. II. Analysis with monoclonal antibodies. J. Immunol., **127**, 244-251 (1981).
11) **Lum, L. G., Orcutt-Thorderson, N., Seigneuret, M. C. & Storb, R.** : The regulation of Ig synthesis after marrow transplantation. IV. T4 and T8 subset function in patients with chronic graft -versus-host disease. J. Immunol., **129**, 113-119 (1982).
12) **Lum, L. G., Seigneuret, M. C., Storb, R. F. Witherspoon, R. P. & Thomas, E. D.** : In vitro regulation of immunoglobulin synthesis after marrow transplantation. I. T-cell and B-cell deficiencies in patients with and without chronic graft-versus-host disease. Blood, **58**, 431-439 (1981).
13) **Livnat, S., Seigneuret, M., Storb, R. & Prentice, R. L.** : Analysis of cytotoxic effector cell function in patients with leukemia or aplastic anemia before and after marrow transplantation. J. Immunol., **124**, 481-490 (1980).
14) **Harada, M., Yoshida, T., Funada, H., Kodo, H., Mori, T., Ishino, C., Matsue, K., Shiobara, S., Ohtake, S., Odaka, K., Teshima, H., Kondo, K., Nakao, S., Ueda, M., Nakamura, S. & Hattori, K.** : Allogeneic bone marrow transplantation for the tretment of acute leukemia : The Kanazawa experience. Jpn. J. Clin. Oncol., **12**, 301-314 (1982).
15) **Hattori, K., Harada, M., Yoshida, T., Ishino, C., Funada, H., Kodo, H., Mori, T., Matsue, K., Shiobara, S., Odaka, K., Ohtake, S., Teshima, H., Kondo, K., Yamamura, M., Nakao, S., Ueda, M. & Nakamura, S.** : A preliminary report on autologous bone marrow transplantation for the treatment of advanced non-Hodgkin's lymphoma. Jpn. J. Clin. Oncol., **12**, 171-180 (1982).
16) **Witherspoon, R. P., Storb, R., Ochs, H. D., Flouronoy, N., Kopecky, K. J., Sullivan, K. M., Deeg, H. J., Sosa, R., Noel, D. R., Atkinson, K. & Thomas, E. D.** : Recovery of antibody production in human allogeneic marrow graft recipients : Influence of time posttransplantation, the presence or absence of chronic graft-versus-host disease, and antithymocyte globulin treatment. Blood, **58**, 360-368 (1981).
17) **Witherspoon, R. P., Matthews, D. & Storb, R.** : Recovery of in vivo cellular immunity after human marrow grafting : Influence of time post-grafting and acute graft-versus-host disease. Transplantation, in press.
18) **Witherspoon, R. P., Lum, L. G., Storb, R. F. & Thomas, E. D.** : In vitro regulation of immunoglobulin synthesis after human marrow transplantation II. Deficient T and non-T lymphocyte function within 3-4 months of allogeneic, syngeneic, or autologous marrow grafting for hematologic malignancy. Blood, **59**, 844-850 (1982).
19) **Tsoi, M. S., Storb, R., Dobbs, S., Kopecky, K. J., Santos, E., Weiden, P. L. & Thomas, E. D.** : Nonspecific suppressor cells in patients with chronic graft-versus-host disease after marrow grafting. J. Immunol., **123**, 1970-1976 (1979).
20) **Tsoi, M. S., Storb, R., Dobbs, S. & Thomas, E. D.** : Specific suppressor cells in graft host tolerance of HLA-indentical marrow transplantation. Nature, **292**, 355-357 (1981).
21) **末永孝生・原田実根・塩原信太郎・尾高和亮・近藤邦夫・上田幹夫・中尾真二・三沢利博・大竹茂樹・服部絢一**：同種骨髄移植患者キメラ細胞に観察された MLC 及び PHA 反応抑制細胞. 日血学会誌, **46**, 767 -771 (1983).
22) **Tutschka, P. J., Ki, P. F., Beschorner, W. E., Hess, A. D. & Santos, G. W.** : Suppressor cells in transplantation tolerance. Transplantation, **32**, 321 -325 (1981).
23) **Azogui, O., Gluckman, E. & Fradelizi, D.** : Inhibition of IL2 production after human allogeneic bone marrow transplantation. J. Immunol., **131**, 1205-1208 (1983).

Studies on Immunological Reconstitution after Bone Marrow Transplantation [II] The Role of MLC-Suppressor Cells on Low MLC Reactivity in Eauly Posttransplant Patients Mikio Ueda, Department of Internal Medicine (III), (Director: Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **93**, 46–57 (1984)

Key words: Bone marrow transplantation, Mixed lymphocyte culture, Suppressor cell

Abstract

Suppressor cells were examined for the responsibility in the low mixed lymphocyte culture (MLC) reactivity observed in short-term patients after allogeneic and autologous bone marrow transplantation. The suppressor activity was studied by adding peripheral blood mononuclear cells (PBMC), as modulator cells, from transplant patients to the two-way MLC of normal PBMC (control MLC). In the control MLC, 5 X 10^4 PBMC from normal individuals were cultured as responder and stimulator cells. To the control MLC, three concentrations (responder: modulator ratio = 1:0.25, 1:0.5 & 1:1) of modulator cells were added. When PBMC from patients were cultured with PBMC from normal individuals, the average MLC reactivity was 24% of the control value. When PBMC from the other normal individuals were added to the control MLC as modulators, the reactivity was enhanced. In contrast, when PBMC from patients were added to the control MLC, the reactivities were suppressed to 32% of the control MLC in a dose-dependent fashion. Then these MLC-suppressor cells were characterized immunologically and the followings were obtained: 1) Suppressor activity was elaborated by T-cells forming rosette with sheep red blood cells; 2) When modulator cells were treated with monoclonal antibodies specific to T-cell differentiation antigens and complement before addition to the control MLC, suppressor activity was completely abolished by treatment with OKT8 and OKIal; 3) Modulator cells irradiated by 3,000 rads still exerted their suppressor activity; 4) Suppressor cells did not require human leukocyte antigen (HLA) compatibility between modulator and responder cells; 5) Suppressor activity was not mediated by cytotoxic T cells. Subsequently, effects of these MLC-srppressor cells were analysed in relation with the MLC reactivities of patients and with the term elapsing after transplantation. The suppressor activity was inversely correlated with the MLC reactivities and the correlation was strongly significant ($P<0.001$). Furthermore, the suppressor activity declined gradually along with the elapse of time and disappeared around 200-365 days after transplantation. These observations, together with our previous data indicating that reactivity of one-way MLC in transplant patients recovered to normal range within 1 yr posttracsplant, suggest that the reactivities in MLC observed during an early posttransplant period may be lowered mainly by the effects of nonspecific MLC-suppressor T-cells, which are OKT8- and OKIal-positive and radioresistant. It is also indicated that MLC reactivities in transplant patients will be normalized when these MLC-suppressor cells disappesr 200-365 days after transplantation.