

# 急性感染症におけるリンパ球活性化の新たな指標： アネキシンV結合法によるアポト-シス指向性リンパ 球の検出

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9317">http://hdl.handle.net/2297/9317</a>

## 急性感染症におけるリンパ球活性化の新たな指標： アネキシンV結合法によるアポトーシス指向性リンパ球の検出

金沢大学医学部医学科小児科学講座 (主任：小泉 晶一教授)

布 上 孝 志

リンパ組織微小環境内で抗原刺激を受けて活性化したリンパ球は、分化増殖の後に末梢へ向かいその機能を発揮する。しかし増殖した活性化リンパ球の大部分はアポトーシスに至り、貪食細胞などの働きにより速やかに生体内より除去される。従って、抗原刺激の指標となるこれら活性化リンパ球を末梢血中に検出することはまれである。本研究では、末梢血中のアポトーシス指向性リンパ球の出現をアネキシンV (annexin V) 結合法により検討した。アネキシンVはアポトーシス早期に細胞膜表面に露出するフォスファチジルセリン (phosphatidyl serine, PS) に特異的に結合する性質を有している。アポトーシス指向性リンパ球は、形態学的に正常リンパ球と区別できず、前方散乱が正常でかつヨウ化プロピジウム (propidium iodide, PI) を結合しない細胞と定義した。しかし、これらの細胞は、短時間の試験管内での培養の後に表面にPSを発現、蛍光標識したアネキシンVを強く結合した。正常対照、あるいは急性発熱疾患患児の末梢血より分離した直後のリンパ球は、全くアネキシンVを結合しなかった。しかしながら、急性感染症患児のリンパ球の一部は短時間の培養の後に強いアネキシンV結合性を示した。一方、正常対照由来のリンパ球は試験管内での培養の後もアネキシンVを結合せず、このようなアポトーシス指向性リンパ球の出現は急性感染症に特徴的であることが示唆された。細菌感染症ならびにウイルス感染症において、アネキシンV結合細胞の多くはB細胞であった。しかし、ウイルス感染症においては、T細胞の一部も明らかにアネキシンVを結合した。ナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞によるアネキシンV結合は殆ど認められなかった。アネキシンVを結合するT細胞の殆どはHLA-DRやCD45ROなどの活性化表面抗原を発現しており、このようなT細胞が生体内で活性化された細胞であることが示された。短時間培養で誘導されるアポトーシスに対して、インターロイキン (interleukin, IL)-2あるいはIL-4の効果は多様であったが、一部の症例においてはCD8陽性T細胞およびB細胞のアネキシンV結合が著しく抑制された。弱毒化生ワクチン接種後24時間で末梢血中にアポトーシス指向性リンパ球の検出が可能であった。B細胞のかなりの部分と、T細胞のごく一部にアネキシンV結合性が誘導された。これらの結果より、アネキシンV結合法により検出されるアポトーシス指向性リンパ球の出現が、生体内での抗原感作によるリンパ球活性化を直接反映していることが示された。本法は、従来の表面抗原解析に比して、より感度が高い、リンパ球活性化の有用な指標となる可能性が示唆された。

**Key words** acute infection, lymphocyte activation, apoptosis, annexin V

リンパ球は抗原刺激により活性化され、増殖分化することにより、そのエフェクター機能を発揮することが知られている。このような抗原特異的リンパ球の活性化は通常、濃縮された抗原刺激と抗原提示細胞の存在するリンパ節等、末梢リンパ組織内で有効に惹起されていると考えられている。増殖した抗原特異的リンパ球の一部は、抗原に対する強い親和性を獲得することにより、リンパ節内の微小環境での選択過程を経て、抗原が消失した後もメモリー細胞として生体内に残存し次の抗原刺激に備えることが示唆されている<sup>1)</sup>。一方、活性化リンパ球の大部分は増殖の後アポトーシスに陥ると考えられる。また、アポトーシス死に陥った細胞は速やかに細網内皮細胞に貪食され排除される<sup>2)</sup>。従って、通常の感染症においてはリンパ節内にお

けるリンパ球活性化は末梢血に反映されず、末梢血中に活性化リンパ球の増加を認めることは殆どない。しかし、Epstein-Barrウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) の初感染像である伝染性単核症などにおいてはポリクローナルなT細胞活性化が惹起され、リンパ節や脾臓の著明な腫脹とともに、末梢血においても活性化T細胞の著しい増加が観察されている<sup>3) 4)</sup>。またこのような活性化T細胞は、末梢血より単離し試験管内で短時間培養することにより速やかにアポトーシスに陥ることが知られている<sup>5)</sup>。さらに骨髓移植後に速やかに増加してくる細胞も、その殆どがCD45RO、HLA-DRなどの活性化抗原を有し、その多くがアポトーシスに至り易い細胞であることが報告されている<sup>6)</sup>。したがって、これらの活性化T細胞は生体内で既にアポ

平成10年6月17日受付，平成10年8月11日受理

Abbreviations : EBV, Epstein-Barr virus; FITC, fluorescein isothiocyanate; FCS, fetal calf serum; IL, interleukin; mAb, monoclonal antibody; MNC, mononuclear cell; NK, natural killer; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin chlorophyll protein; PI, propidium iodide; PS, phosphatidyl serine; VZV, varicella zoster virus

トーシスにプログラムされた細胞であると考えられる。

急性感染症や特定の抗原刺激が関与した疾患において、末梢血中リンパ球の活性化を検出することは、疾患の病態や治療反応性を評価する上で極めて重要なことと思われる。その手段としては、T細胞上のHLA-DR抗原やCD45RO発現が用いられたり<sup>30-32</sup>、NK細胞上のCD69抗原が指標となることが知られている<sup>33-35</sup>。しかし、CD45RO抗原は活性化T細胞のみならずメモリーT細胞の指標としても使われていることから、活性化マーカーとしての特異性は少ない<sup>32,33</sup>。一部の急性感染症や他の炎症性疾患においてはT細胞表面のHLA-DR発現が活性化の指標として有力であることは知られているが、一般には伝染性単核症を例外として急性感染症でHLA-DR陽性T細胞の増加を検出することは困難である。さらに、B細胞の活性化の指標となる有用な抗原は知られておらず、生体内でのB細胞活性化を末梢血検体を用いて客観的に評価することは殆どなされていない。

一方、細胞が死のシグナルを受けアポトーシスが惹起されると急速にミトコンドリア機能の変化が起こり<sup>10-12</sup>、これを反映して特徴的な形態変化が起こる前に、細胞膜リン脂質の分布異常が起こることが知られている<sup>13</sup>。フォスファチジルセリン (phosphatidyl serine, PS) は膜リン脂質の選択的分布調節機構により、生細胞ではその殆どが細胞膜内側に分布し、表面には露出していない。しかし、アポトーシスが惹起されると、その極めて早期にPSが細胞膜外側に露出し<sup>18,19</sup>、貪食の標的になると考えられている<sup>20,21</sup>。アネキシンV (annexin V) はこのPSに対する特異的結合能を有し、アネキシンVの結合を指標として細胞表面にPSを露出した細胞を同定することが可能である<sup>19-23</sup>。このような方法により、細胞の形態変化やDNA断片化を指標とした従来のアポトーシス評価法と異なり、アポトーシス早期の細胞集団を生細胞の状態でも、しかも高感度で検出することが可能である。本研究では、フローサイトメトリー法を駆使して、急性感染症患児の末梢血リンパ球中に早期の膜リン脂質分布の変化を示す細胞集団が出現するか否かを検討した。

#### 対象および方法

##### I. 対 象

対象は金沢大学医学部附属病院小児科外来ならびに関連病院小児科外来を受診した患児 (2~9歳) とした。伝染性単核症はいずれも急性期で、発熱、扁桃炎、頸部リンパ節腫大、肝脾腫などの典型的な臨床像を示し、血液生化学検査では種々の程度の肝機能障害を示す症例を選んだ。いずれの症例も末梢血ではリンパ球、特に異型リンパ球の増加が認められ、フローサイトメトリー法による検討ではHLA-DR、CD45ROを強く発現する活性化CD8陽性T細胞の著増が観察された。最終的な診断はEBV-ウイルスカプシド抗原 IgG高値、EBV核抗原陰性など、EBV初感染に一致する抗体価パターンにより確認した。その他の急性感染症は、採血時あるいは12時間以内に38.5℃以上の強い発熱を示した症例とし、1週間以上発熱が持続している症例や慢性炎症性疾患に伴う発熱症例は除外した。

このうち、細菌性肺炎、尿路感染症や細菌性髄膜炎など、臨床検査や培養所見から急性細菌感染症であることが明らかなるものを細菌感染症とした。また、水痘、流行性耳下腺炎、突発性発疹症、風疹など特徴的な臨床症状を示し、診断が明らかな症例をウイルス感染症とした。但し、末梢血白血球数の著明な増加や炎症反応の亢進を認める症例は除外した。

##### II. 末梢血単核細胞の分離ならびに培養

末梢血単核細胞 (mononuclear cell, MNC) はヘパリン加静脈血よりフィコール・ハイパーク (Ficoll-Hypaque) 比重遠心法により単離した。単離したMNCはリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.2) にて洗浄、10%非動化牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS)、25mM HEPES、 $2 \times 10^{-5}$ M 2-メルカプトエタノール、0.3 mg/ml グルタミン、200 U/ml ペニシリンG、10 mg/ml ゲンタマイシンを含むPRMI 1640培養液 (Gibco Laboratories, Grand Island, USA) に再浮遊した。細胞濃度を $1 \times 10^6$ /mlに調節し、24穴プラスチック培養プレート (Cell Culture Cluster, Tissue Culture Treated, No. 3524, Costar, Cambridge, USA) にて一定時間培養した。一部の実験では培養開始時にヒトリコンビナントインターロイキン (interleukin, IL)-2 (塩野義製薬、大阪) 200単位 (unit, U) /mlあるいはヒトリコンビナントIL-4 (Pharmingen, San Diego, USA) 50 ng/mlを添加し培養した。

##### III. リンパ球亜群におけるアネキシンV結合解析

培養細胞をPBSにて2回洗浄、PBSに再浮遊しフィコエリスリン (phycoerythrin, PE) 標識抗Leu-2a (CD8)、抗Leu-11c (CD16)、抗Leu-16 (CD20) 単クローン抗体 (monoclonal antibody, mAb) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA) もしくは抗CD4 mAb (DAKO Co., Copenhagen, Denmark) と4℃、20分間反応させた。T細胞活性化抗原発現との関連を検討するためには、PE標識抗HLA-DR mAb (Becton Dickinson) あるいはPE標識抗CR45RO mAb (DAKO) とペリジニクロロフィル蛋白 (peridinin chlorophyll protein, PerCP) 標識抗CD4 mAbあるいはPerCP標識抗CD8 mAb (DAKO) と反応させた。表面抗原染色の後、1% FCSならびに0.1%アジ化ナトリウムを添加したPBSで1回洗浄、おおよそ $1 \times 10^6$ /mlの濃度で100 mlのアネキシンV結合解析用ヘベス緩衝液 (HB; 20 mM ヘベス、140 mM 塩化ナトリウム、5 mM 塩化カリウム、1 mM 塩化マグネシウム、2.5 mM 塩化カルシウム、1.2 mM リン酸二水素カリウム、0.5%ウシ血清アルブミン) に浮遊した。フルオレッセン・イソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識アネキシンV (Bender Medsystem, Vienna, Austria) を最終希釈1:500で細胞浮遊液に添加、室温で遮光し15分間反応させた。反応終了後、500 mlのHBを添加しフローサイトメーター (Cyturon Absolute, Ortho Diagnostic Systems, 東京) を用いてアネキシンV結合を解析した。

##### IV. ヨウ化プロピジウム取り込み試験

細胞死に至り、細胞膜透過性が亢進した細胞ではDNA結合色素であるヨウ化プロピジウム (propidium iodide, PI) が取り込まれこれを排除することが出来ない。この性質を利用し、不可逆的な細胞死に陥った細胞をPIの赤色蛍光の強さを指標としてフローサイトメトリー法により解析した。FITC標識アネキシンVを結合させた細胞浮遊液に、解析前に最終濃度が10 µl/mlとなるようにPI溶液を添加しフローサイトメトリーにより2カラー解析を行った。

##### V. セルソーターによるアネキシンV結合細胞の単離

伝染性単核症の患者よりMNCを分離し2時間培養、上記の方法に従い、PIならびにアネキシンVを結合させた後にフローサイトメーターにより蛍光パターンを解析した。リンパ球領域の細胞のうち、PI陰性細胞に関してFITC陰性細胞群と陽性細胞群を確認、これらをセルソーター (Epics Elite, Coulter

Electronics Inc., Hialeah, USA) により単離した。得られた細胞群をPBSにて洗浄の後、サイトスピ標本を作成しメイ・ギムザ染色を施行、それぞれの形態的特徴を光学顕微鏡にて観察した。

Ⅵ. ワクチン接種による末梢血リンパ球アポトーシスの誘導  
発熱、咳嗽、鼻汁などの急性感染症状のない健常成人5名(25~35歳)を対象とした。すべての症例でワクチン接種とリンパ球アポトーシスの検索に関して事前に承諾を得た。予め対

象となるウイルス感染症の既往の有無を、血清中特異抗体価の測定により判断した。血球凝集抑制反応による抗体価4倍以下を陰性(未感染)とし、感染既往がないと考えられるウイルスに関して弱毒生ワクチンを接種した。最終的にワクチン接種の対象となった症例は、ムンプスワクチン接種が4名、風疹ワクチン接種が1名であった。ムンプス陰性者には乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン(武田, 大阪), 風疹陰性者に乾燥弱毒生風疹ワクチン(武田)を接種した。ワクチン接種直前と接種24時間

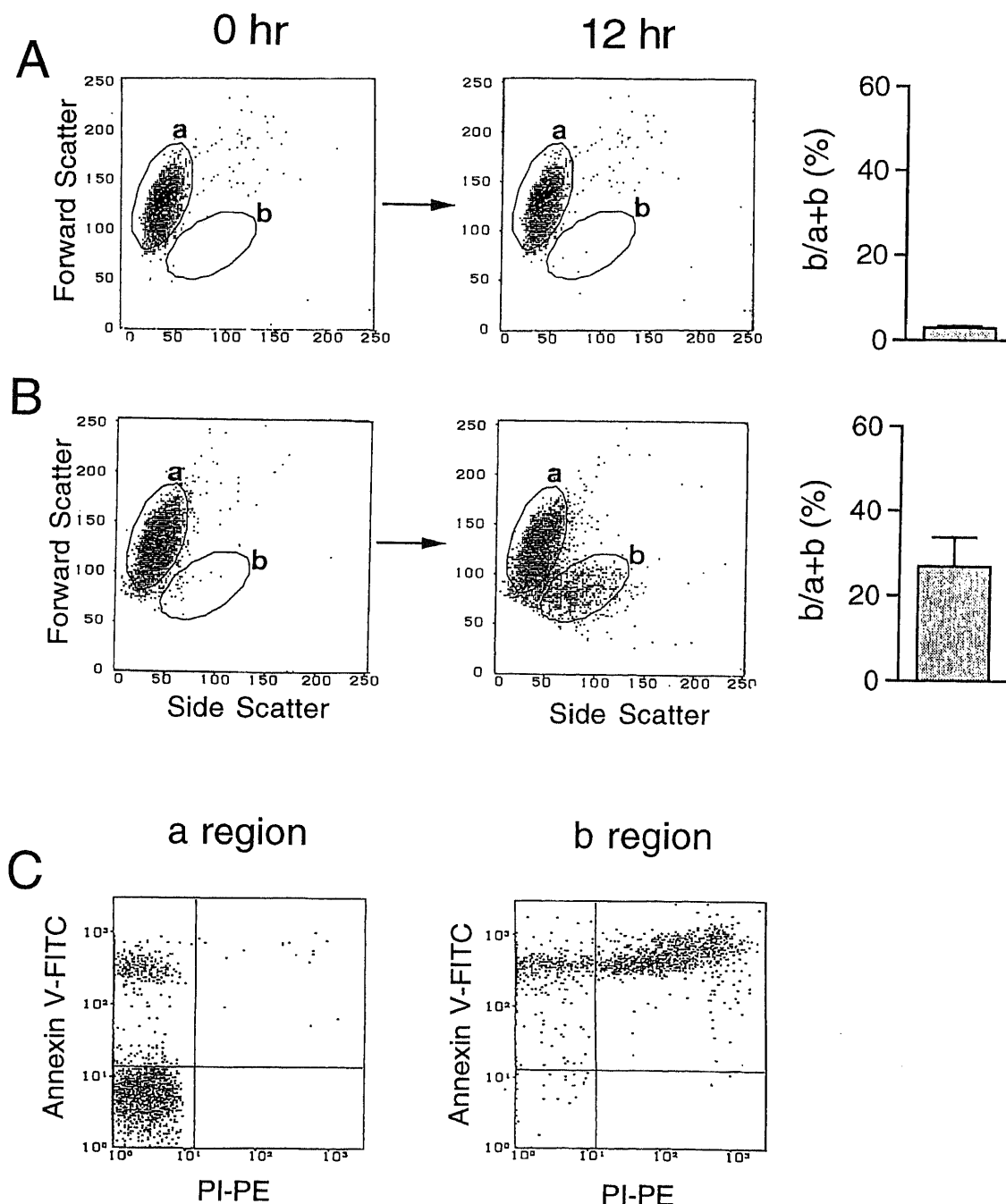


Fig. 1. Flow cytometric analysis of lymphocyte apoptosis. Mononuclear cells (MNC) from normal controls (A) and infectious mononucleosis (B) were freshly isolated and incubated for 12 hr. Dead cells (b) were discriminated from viable cells (a) by a decrease in forward light scatter on cytogram. The bars represent the mean percentages of dead cells (+ SD) of 5 separate experiments. (C) The cultured cells from infectious mononucleosis were reacted with FITC-labeled annexin V and propidium iodide (PI). Viable cells (a) and dead cells (b) were gated and annexin V-binding and PI uptake were analyzed simultaneously by a two-color flow cytometry.

後にヘパリン加採血を施行，MNCを分離し12時間培養した。培養終了後細胞を洗浄，表面抗原を染色の後，FITC標識アネキシンV結合を検討した。ワクチン接種後に発熱を含め有意な副作用を認めた症例はなかった。

#### Ⅶ. 統計処理法

得られた値は全て平均値±標準偏差で表した。平均値の有意差検定にはWelchのt検定を用いた。危険率5%未満の場合( $p < 0.05$ )を統計学的有意差ありと判定した。

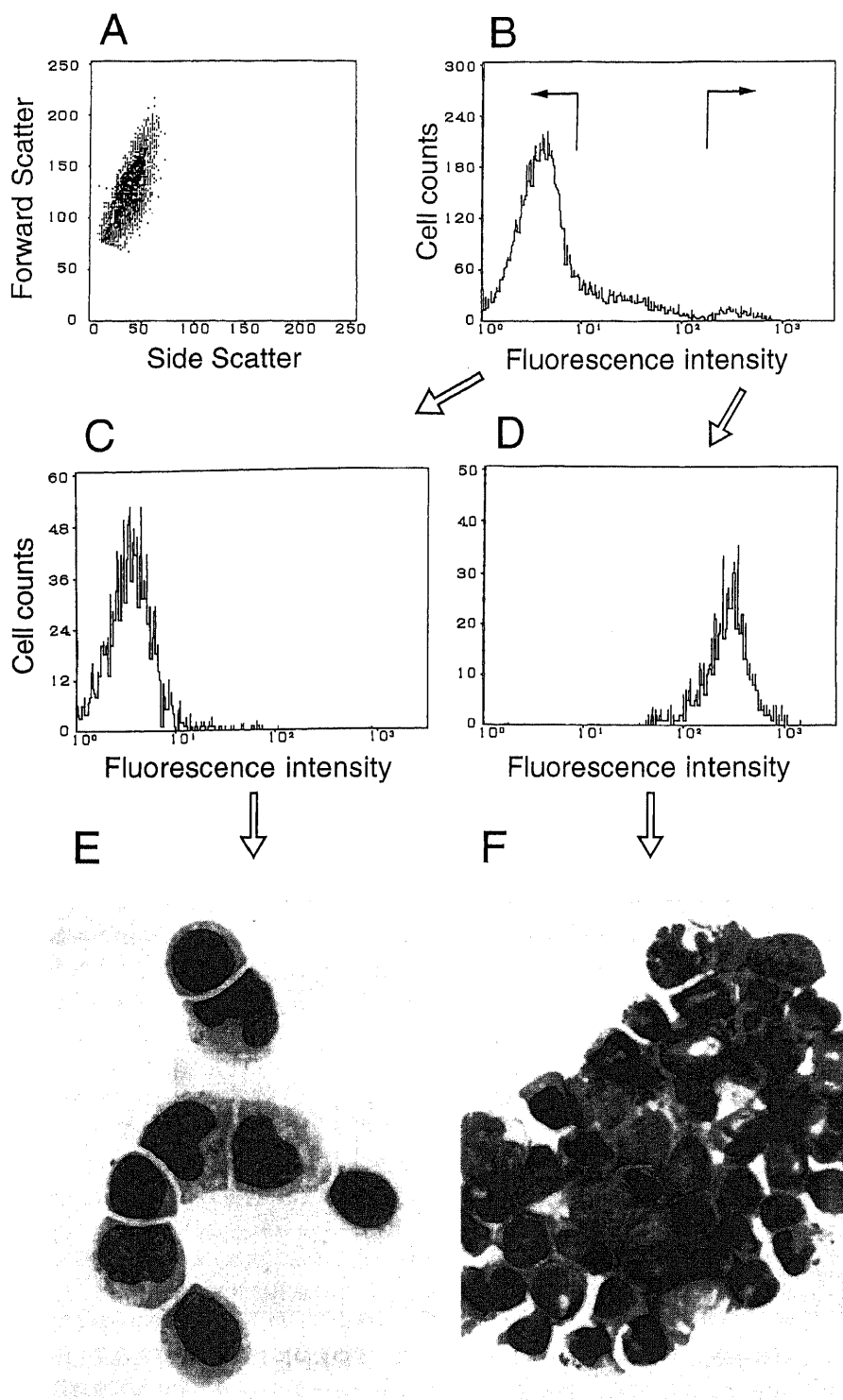


Fig. 2. Morphological characterization of annexin V-binding lymphocytes. MNC from acute infectious mononucleosis were freshly isolated and incubated for 2 hr. The cells were reacted with FITC-labeled annexin V and analyzed by a flow cytometry (A and B). Annexin V-negative (C) and Annexin V-positive (D) cells were separated by a cell sorter. Cytospin preparations were made and morphology of the cells was examined under a light microscopy after May-Grundwald Giemsa staining (E and F).

成 績

I. アネキシンV結合を用いたアポトーシス検出法の検討

伝染性単核症の患者および正常対照より単離した末梢血単核球を12時間培養し、培養前、後それぞれのMNCをフローサイトメトリーにより解析した(図1)。正常リンパ球は図のa領域に、アポトーシスに至った細胞は前方散乱の低下した領域(b領域)に細胞集団として観察できた。双方とも培養前にはb領域に細胞集団は見られなかった。伝染性単核症(図1B)においては12時間培養後b領域に細胞集団が観察されたが、正常対照(図1A)では12時間培養後もb領域に細胞はほとんど検出されなかった。培養後の前方散乱低下により同定されるアポトーシス細胞の比率(b領域/a領域+b領域)は正常対照で $2.8 \pm 0.3\%$ (平均±標準偏差)、伝染性単核症で $27.2 \pm 6.6\%$ であり、後者で明らかにアポトーシスの亢進が認められた( $p < 0.001$ )。次に、培養後の伝染性単核症患者の単核球をPIおよびFITC標識アネキシンVで標識、a、bそれぞれの領域において2カラー解析を行った(図1C)。b領域では殆どの細胞がアネキシンVと結合し、かつその多くはPI陽性であり、アポトーシスに至った細胞集団であることが確認された。一方、a領域ではPI陽性細胞は殆ど認めなかったが、一部の細胞はアネキシンVを強く結合した。

さらに伝染性単核症患者リンパ球を2時間培養、前方散乱の低下のないリンパ球領域の細胞をアネキシンV結合性の有無により単離、それぞれの形態学的特徴を光学顕微鏡にて比較した(図2)。短時間培養細胞はその殆ど全てがリンパ球領域に含まれ、前方散乱の低下は全く認められなかった(図2A)。これらの細胞のごく一部は強いアネキシンV結合性を示し(図2B)、セル・ソーターによりアネキシンVを全く結合しない細胞群(図2C)と、強くアネキシンVを結合する細胞群(図2D)が単離された。アネキシンVを結合する細胞の多くは、クロマチンの凝縮傾向や核の断裂などアポトーシスに特徴的な所見を示した(図2F)。このような細胞は、フローサイトメーターによる解析の時点ですでにアポトーシスへのプログラムが開始しており、

セル・ソーターによる単離や洗浄の過程で形態学的変化を示すまでに進行したと考えられる。従って、このような細胞(前方散乱が正常でPI結合を示さず、アネキシンVを強く結合する細胞)を「アポトーシス指向性細胞」として以下の検討を進めた。一方、アネキシンV非結合細胞は通常のリンパ球形態を示し、細胞膜や核の構造も正常に認められた(図2E)。

II. アポトーシスならびに細胞死検出感度の比較(図3)

伝染性単核症患者由来のリンパ球を培養し、経時的なアポトーシス細胞の出現をアネキシンV結合法とPI法とで検出感度を比較検討した。アポトーシスは前方散乱の低下およびPI結合性、あるいはアネキシンV結合性により同定した。アネキシンV結合法では培養早期よりFITC強陽性のアポトーシス指向性

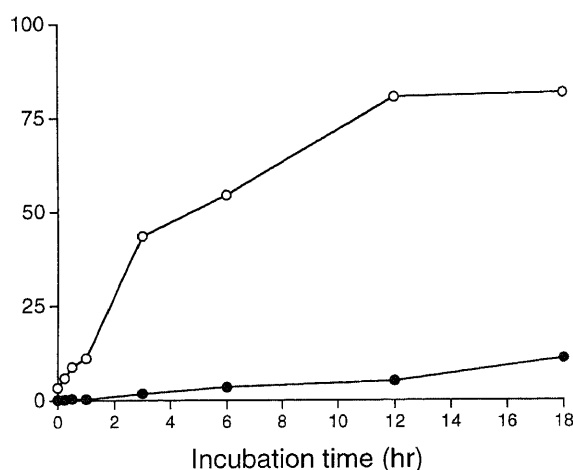


Fig. 3. Kinetics of apoptosis detected by annexin V binding and PI uptake. Lymphocytes from acute infectious mononucleosis were freshly isolated and cultured for indicated periods. Cells were reacted with annexin V or PI after the culture. Percentages of annexin V-binding cells (open circle) and PI-positive cells (closed circle) were quantitated by a flow cytometry.

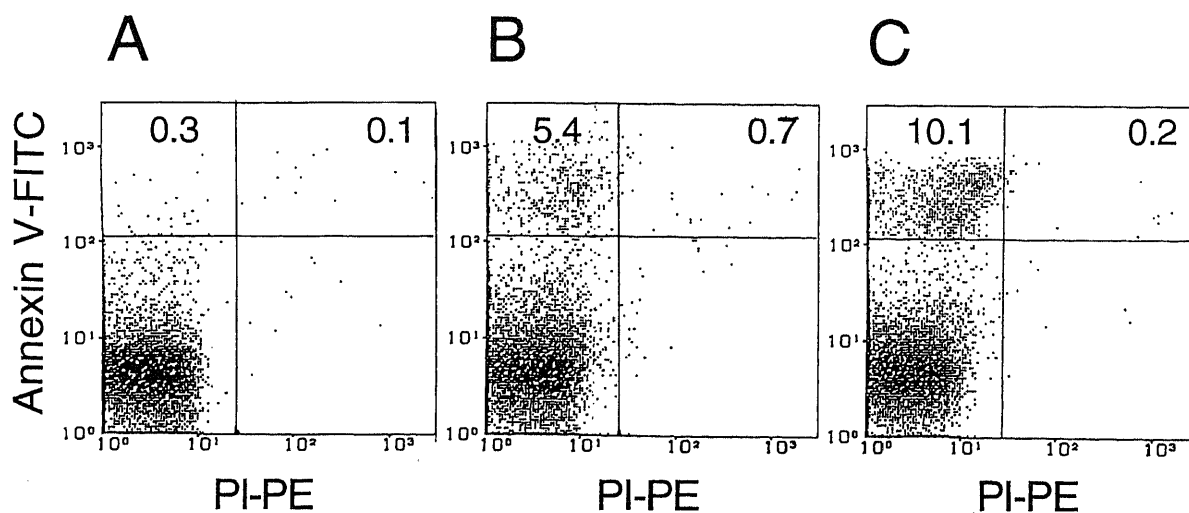


Fig. 4. Detection of annexin V-binding cells in acute infection. Lymphocytes from acute viral infection were freshly isolated and cultured. Annexin V binding and PI uptake were examined simultaneously before (A), 3 (B) and 12 hr (C) after the culture.

細胞が確認され、3時間後より急速に経時的にその比率が上昇した。それに比し、PI法では培養開始3時間後までは陽性細胞は殆ど出現せず、それ以後徐々に増加した。

### Ⅲ. 急性感染症におけるアポトーシス指向性リンパ球の検出 (図4)

急性感染症において、分離したMNCを培養し、リンパ球のアネキシンV結合を経時的に観察した。12時間培養までは、前方散乱の低下を示す細胞集団は全く観察されなかった。培養開

始前にはアネキシンV結合性を示す細胞は極めてわずかしが認められなかった (図4A)。しかし、培養開始3時間後にはアネキシンVを強く結合する細胞集団が出現した (図4B)。これらの細胞集団の比率は経時的に増加し、本症例では12時間後には10.3%に達した (図4C)。一方、アネキシンV結合の有無に関わらず、PI結合性を示す細胞は殆ど出現しなかった。急性感染症 (12例) と、伝染性単核症 (4例)、正常対照 (8例) において培養前と培養12時間後の変化についてアネキシンV合細胞の比率を

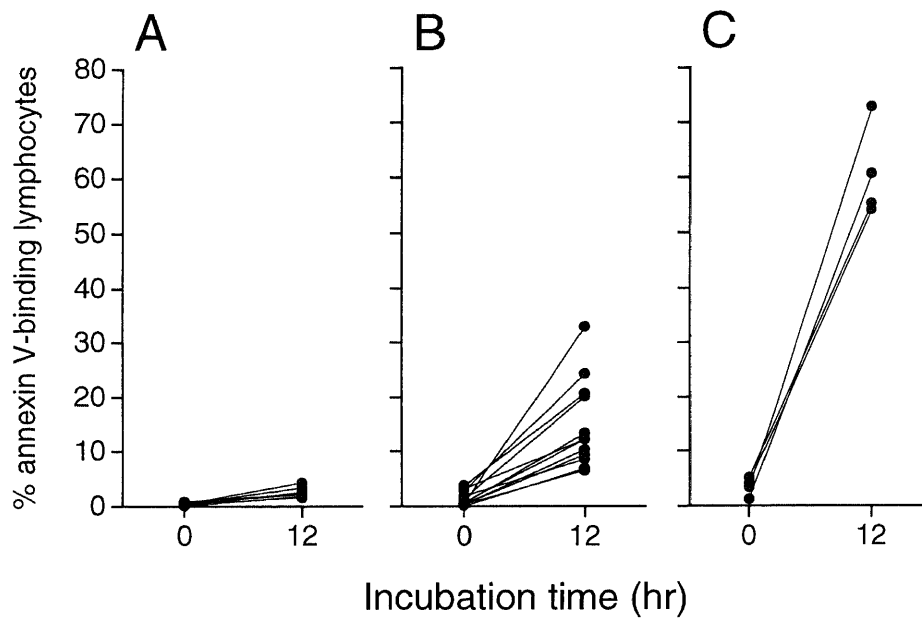


Fig. 5. Comparison of percentages of annexin V-binding cells among different groups. Lymphocytes from normal controls (A, n=8), acute infection (B, n=12) and infectious mononucleosis (C, n=4) were cultured for 12 hr and annexin V-binding was examined by a flow cytometry.

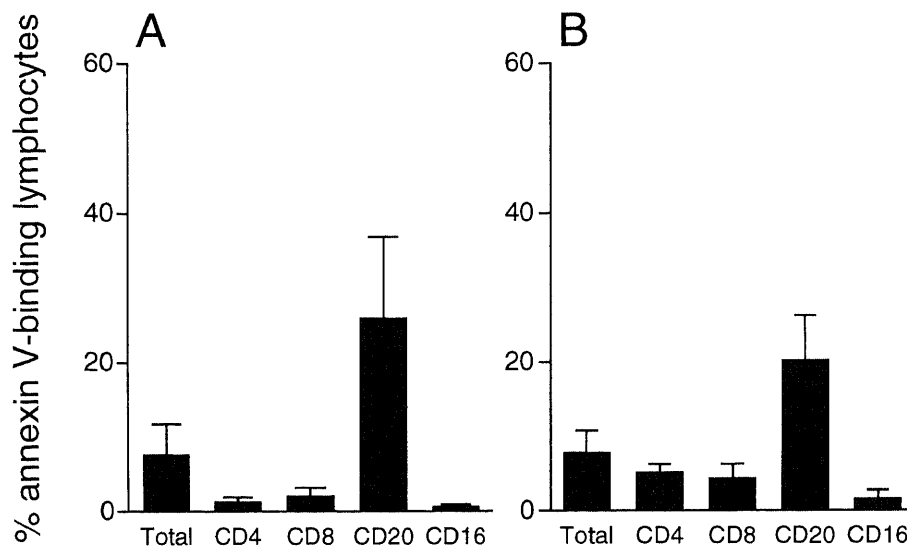


Fig. 6. Annexin V-binding by different lymphocyte subpopulations. Lymphocytes from bacterial infection (A, n=15) and viral infection (B, n=13) were isolated and cultured for 12 hr. The cells were reacted with FITC-labeled annexin V and PE-conjugated anti-CD4, anti-CD8, anti-CD16 or anti-CD20 mAbs. Annexin V-binding on each lymphocyte subpopulation was analyzed by a two-color flow cytometry. ( $\bar{x} \pm$  SD) of annexin V-binding cells are shown.

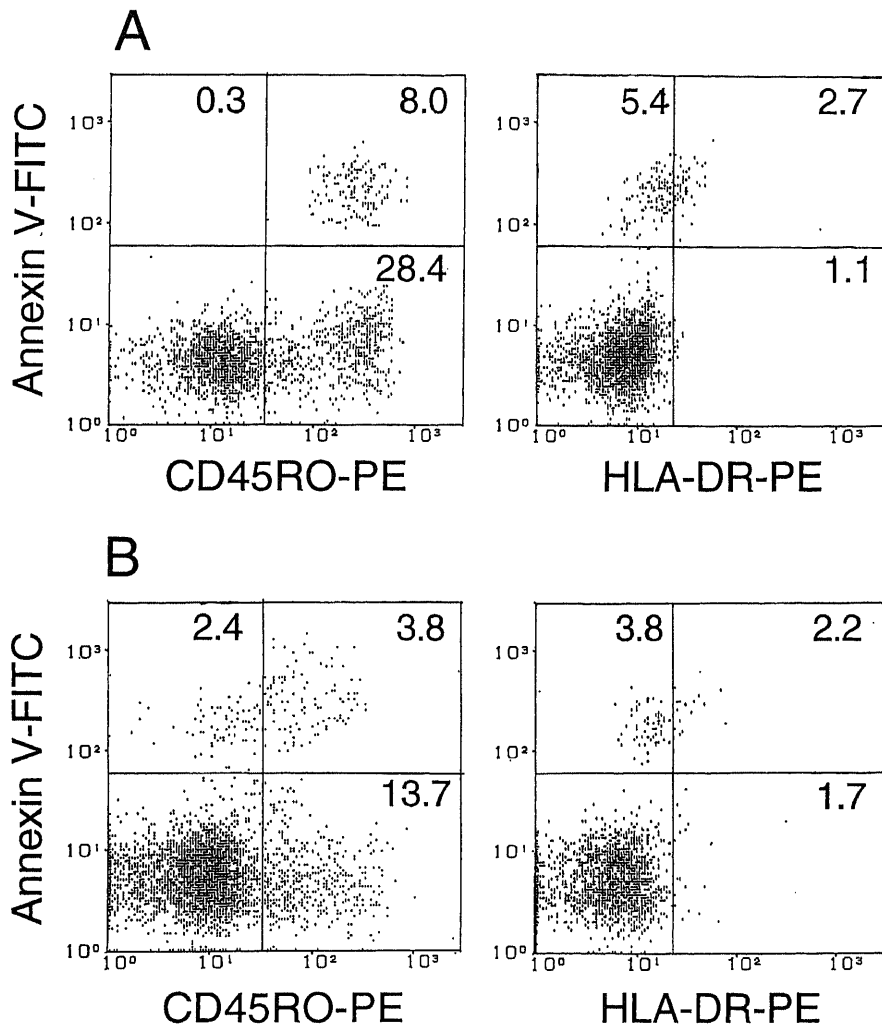


Fig. 7. Three-color analysis of annexin V binding on activated T cells. MNC from acute viral infections were cultured for 12 hr and annexin V binding on lymphocyte subpopulations was compared by a three-color flow cytometry. CD4<sup>+</sup> T cells (A) and CD8<sup>+</sup> T cells (B) were gated separately by PerCP fluorescence. Annexin V binding and expression of CD45RO or HLA-DR were examined simultaneously.

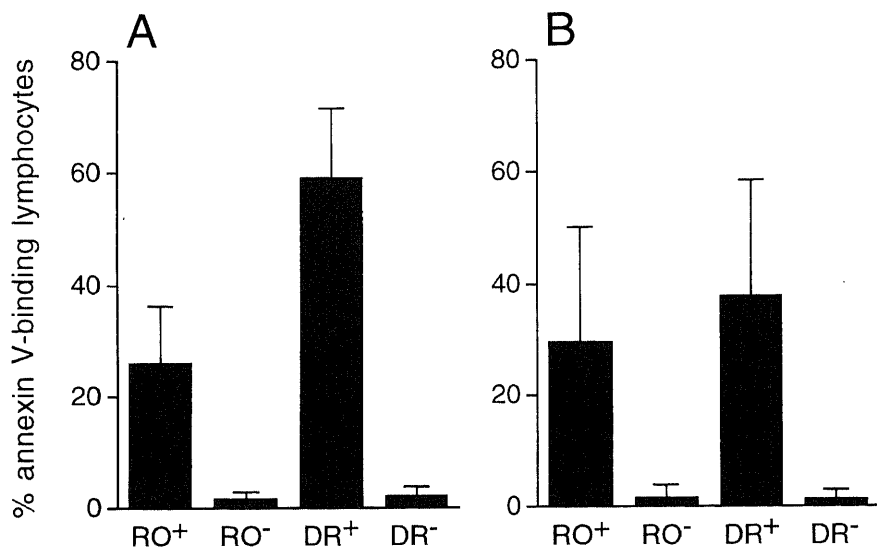


Fig. 8. Expression of activation antigens and annexin V binding on T cells. CD4<sup>+</sup> (A) or CD8<sup>+</sup> (B) T cells were gated and annexin V-binding cells were quantitated among CD45RO<sup>+</sup>, CD45RO<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>-</sup> populations.



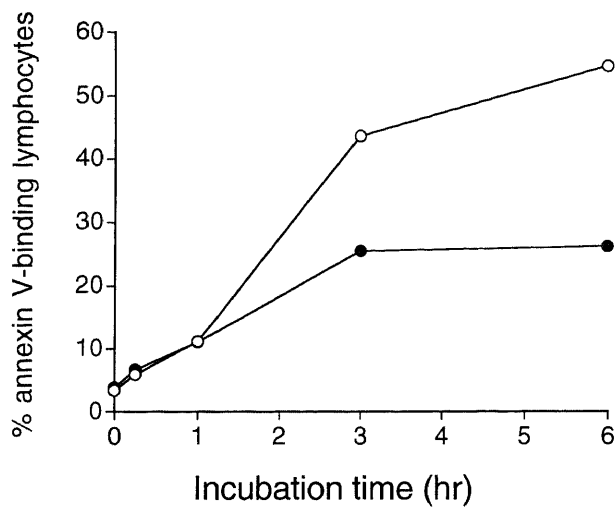


Fig. 9. Inhibitory effect of IL-2 on apoptosis of activated lymphocyte from infectious mononucleosis. MNC from acute infectious mononucleosis were cultured alone (open circle) or in the presence of recombinant IL-2 (200 U/ml) (closed circle). The cells were reacted with FITC-labeled annexin V at the indicated time points and the percentages of annexin V-binding cells were examined by a flow cytometry.

比較検討した (図5). 培養開始前はいずれの群においてもアネキシンV結合細胞の出現は極めて少なく, 末梢血中には膜表面にPSを露出する細胞は殆どないと考えられた. 正常対照リンパ球では12時間後でもアネキシンV結合細胞の出現は殆ど認められなかったが (図5A:  $2.6 \pm 0.8\%$ ), 急性感染症では培養12時間後にアネキシンV結合細胞が正常対象に比し有意に増加した (図5B:  $14.8 \pm 7.7\%$ ,  $p < 0.001$ ). さらに, 伝染性単核症では大部分の細胞が強いアネキシンV結合性を示した (図5C:  $60.8 \pm 7.4\%$ ,  $p < 0.001$ ).

#### IV. リンパ球亜群によるアネキシンV結合比率の比較

急性感染症におけるリンパ球亜群のアポトーシス指向性を比較するために, 細菌感染症 (15例) とウイルス感染症 (13例) につき, PE標識抗CD4 mAb, CD8 mAb, CD16 mAb, CD20 mAb, およびFITC標識アネキシンVによる二重蛍光染色パターンを解析した (図6). 両群ともB細胞 (CD20陽性) のアネキシンV結合比率が高値を示し, T細胞亜群 (CD4, CD8陽性) のアネキシンV結合比率は比較的低値を示した. またCD16陽性NK細胞では, 殆どアネキシンV結合は観察されなかった. 細菌感染症 (図6A), ならびにウイルス感染症 (図6B) におけるリンパ球全体でのアネキシンV結合比率は  $7.6 \pm 4.1\%$ ,  $7.7 \pm 3.1\%$  と有意差はなかった ( $p > 0.5$ ). しかしCD4陽性T細胞中のアネキ

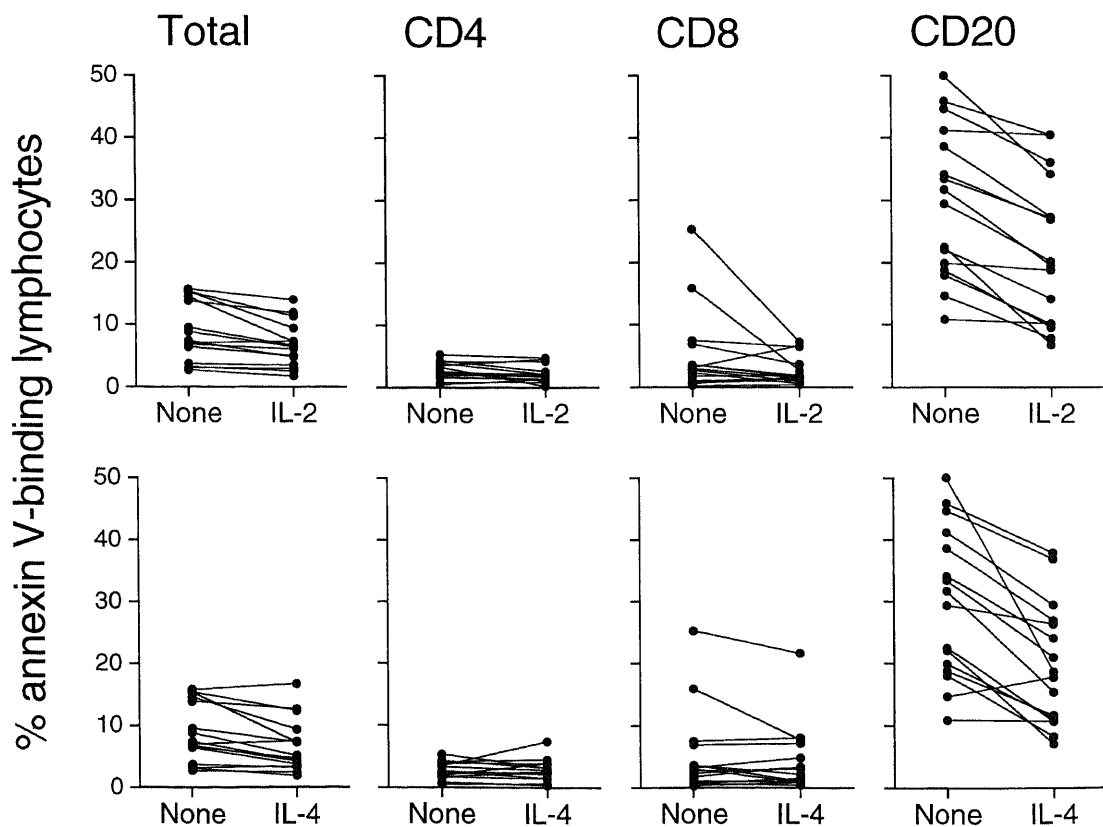


Fig. 10. Inhibitory effect of IL-2 and IL-4 on apoptosis of different lymphocyte subpopulations. MNC from acute infections were cultured for 12 hr either alone, or in the presence of recombinant IL-2 (200 U/ml) or recombinant IL-4 (50 ng/ml). The cells were reacted with FITC-labeled annexin V and PE-conjugated anti-CD4, anti-CD8, or anti-CD20 mAbs.

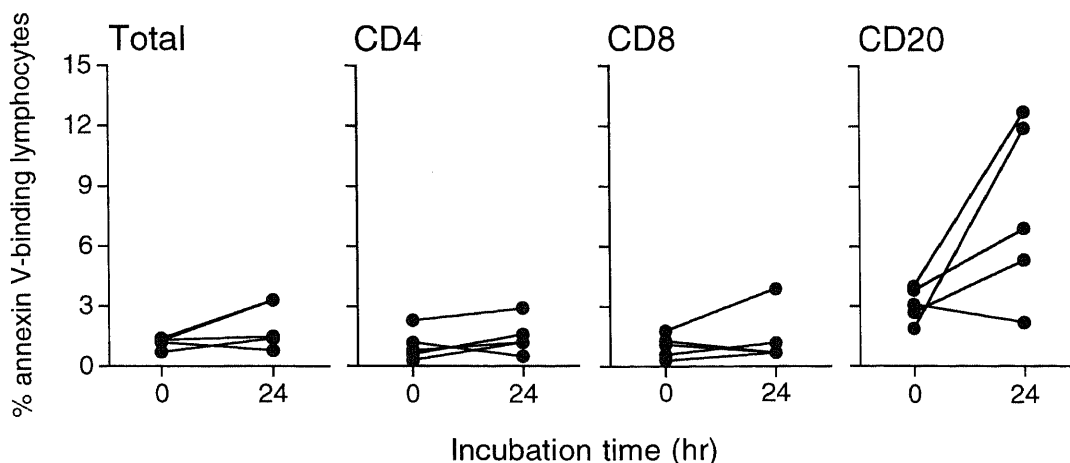


Fig. 11. Detection of annexin V-binding lymphocytes after vaccination. MNC were isolated before and 24 hr after immunization with live-attenuated virus vaccines. The cells were reacted with FITC-labeled annexin V and PE-conjugated anti-CD4, anti-CD8, or anti-CD20 mAbs.

ンV結合細胞の比率は、細菌感染症、ウイルス感染症でそれぞれは  $1.2 \pm 0.7\%$ 、 $5.1 \pm 1.2\%$  ( $p < 0.01$ )、CD8陽性T細胞中ではそれぞれ  $2.0 \pm 1.2\%$ 、 $4.3 \pm 2.0\%$  ( $p < 0.5$ ) であり、細菌感染症に比しウイルス感染症においてT細胞でのアネキシンV結合比率が有意に高いことが示された。

V. アネキシンV結合細胞における活性化抗原発現

急性感染症におけるT細胞亜群の活性化抗原発現とアネキシンV結合との関連を三重標識免疫蛍光法を用いて検討した。PerCP陽性領域に含まれるCD4陽性またはCD8陽性T細胞に関して、PE標識抗HLA-DR mAbおよび抗CD45RO mAb、FITC標識アネキシンVによる二重蛍光染色パターンを解析した。図7に代表的なパターンを示すが、急性感染症においてはCD4陽性細胞(図7A)ではCD45RO陽性細胞に選択的にアネキシンVが結合し、さらにこれらの細胞は弱いながらもHLA-DRを発現していた。CD8陽性細胞(図7B)においても同様の傾向が観察された。これら活性化抗原の発現について、急性ウイルス感染症13例に関してまとめて検討した(図8)。CD4陽性T細胞(図8A)において、CD45RO陽性細胞、陰性細胞のアネキシンV結合細胞比はそれぞれ  $25.9 \pm 10.4\%$ 、 $1.6 \pm 1.3\%$  ( $p < 0.001$ )、HLA-DR発現細胞、非発現細胞のアネキシンV結合細胞比はそれぞれ  $59.1 \pm 12.4\%$ 、 $2.1 \pm 1.7\%$  ( $p < 0.001$ ) であった。CD8陽性T細胞(図8B)において、CD45RO陽性細胞、陰性細胞のアネキシンV結合細胞比はそれぞれ  $29.6 \pm 20.6\%$ 、 $1.6 \pm 1.3\%$  ( $p < 0.001$ )、HLA-DR発現細胞、非発現細胞のアネキシンV結合細胞比は  $37.9 \pm 20.6\%$ 、 $1.3 \pm 1.7\%$  ( $p < 0.001$ ) であり、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞いずれにおいても、活性化抗原であるCD45RO、HLA-DR発現細胞におけるアネキシンV結合細胞比は非発現細胞よりも有意に高かった。

VI. サイトカイン添加によるアポトーシスの抑制(図9)

伝染性単核症患者由来のMNCをIL-2添加群および非添加群に分けて一定時間培養し、アネキシンV結合細胞比の変化を経時的に観察した。培養開始後1~2時間はIL-2添加、非添加群に差異はほとんど認められなかったが、3時間後よりIL-2添加群はIL-2非添加群に比し明らかにアネキシンV結合細胞比率が低値を示した。IL-2添加群では、培養開始4時間以降において

アネキシンV結合細胞の比率が一定となり増加が抑制されたのに対して、非添加群では経時的にアネキシンV結合細胞比率が増加した。

急性ウイルス感染症16例に関して、IL-2あるいはIL-4添加群と非添加群とに分けて12時間培養、その後リンパ球亜群におけるアネキシンV結合の解析を行った(図10)。CD4、CD8、CD20いずれの亜群においてもIL-2、IL-4添加によるアネキシンV結合細胞比に有意差は認めなかった。しかし、個々の症例に関して検討すると、CD8陽性細胞においてはIL-2添加によりアネキシンV結合細胞比が著減する症例が見られた。CD20陽性細胞においてIL-2添加では全例で、IL-4添加では16例中14例においてアネキシンV結合比の低下を認めた。

VII. ワクチン接種によるアポトーシス指向性細胞の誘導(図11)

ワクチン接種後のリンパ球亜群におけるアネキシンV結合性の誘導を二重標識免疫蛍光法を用いて検討した。すなわち、PE標識抗CD4 mAb、CD8 mAbあるいはCD20 mAbとFITC標識アネキシンVによる二重蛍光染色パターンを解析した。症例による変動が大きいが、ワクチン接種24時間後の検討では、5例中4例においてアネキシンV結合細胞比が増加していた。各リンパ球亜群に関して検討すると、CD4陽性T細胞においては5例中4例にアネキシンV結合細胞比の増加が認められた。CD8陽性細胞においては5例中3例に増多を認めた。さらに、CD20陽性細胞は2例において12%前後のアネキシンV結合が認められ、全例の平均でも培養前後で  $3.1 \pm 0.8\%$  から  $7.8 \pm 4.0\%$  ( $p < 0.1$ ) と上昇傾向を認めた。

考 察

核の形態学的特徴やDNA断片化を指標としたアポトーシスの検出法は一般化しているが、これらは既に不可逆的な細胞死に陥った細胞のみが検出の対象となり、ミトコンドリアの変化に代表されるアポトーシス早期の変化を検出することは一般的ではなかった。病理組織や臓器の検索においてはそのようなアプローチが有用であるが、末梢血リンパ球が検討の対象となる場合、形態学的変化を伴った細胞群が定量的評価の対象として

捉えられることは殆どなかった。今回の検討では、アネキシンV結合法が形態学的に特徴的な変化を起こす以前の、細胞膜リン脂質の分布異常を反映する鋭敏なアポトーシス検出法であり、特にフローサイトメトリー法による検討には優れていることが確認された。さらに本研究では短期間培養法を併用することにより、アポトーシスシグナルを受けながらまだ膜リン脂質の分布異常を発現していない細胞を、アポトーシス指向性細胞として検出可能であることが示された。

伝染性単核症で増加するリンパ球が活性化リンパ球であり、短期間の培養によって容易にアポトーシスに陥ることは既に報告されている<sup>40)</sup>。これらの細胞は抗原特異的に活性化され増加したリンパ球であるよりは、非特異的な増殖刺激により増加したポリクローナルな細胞集団である可能性が示唆されている<sup>24)</sup>。一方、一般の急性感染症などにおいては、リンパ節など末梢リンパ組織において抗原特異的リンパ球のみが活性化され、その数は末梢血全体からみるとごくわずかである。このような細胞集団が出現することを客観的に捉える方法は少なく、また抗原刺激後の活性化リンパ球の動態に関しては殆ど知られていない。これまで、破傷風トキソイド接種後の末梢血リンパ球に活性化抗原が一過性に出現することが報告されている<sup>25)</sup>。しかし、破傷風トキソイドを用いた生体内抗原刺激系は既に基礎免疫の成立している個人に対して行っており、抗原刺激後、既にプールされたメモリー細胞の急激な拡大が起こり、末梢血中に活性化抗原発現細胞として検出可能であったと考えられる。しかもこの実験では、一般の急性感染症とは異なり抗原刺激の時期が明らかなため、抗原刺激後一定時間で解析が可能である。従って、経時的な観察が容易であり、一過性に出現した活性化リンパ球を確認することが可能であった。またこの報告で指摘されているとおり、活性化リンパ球は急速に末梢血より消失しており、このようなリンパ球は生体内での活性化後、一定の機構により速やかに流血中から排除されることが示唆された。

末梢血より分離直後のリンパ球を用いた場合、どのような検体であってもアネキシンV結合が殆ど認められず、少なくとも膜リン脂質の分布異常を示す段階にまで進行したアポトーシスは、末梢血中には殆ど検出されないことが明らかとなった。膜リン脂質分布の異常、特にPSを表出することにより細胞はマクロファージなどにより速やかに貪食されることが知られている<sup>26)</sup>。アポトーシスへと進行しつつある細胞が末梢血中に出現しても、単球などの細網内皮系の細胞により膜の変化が認識され速やか排除されるため、これらの細胞は末梢血中で検出されないと考えられる。しかし、すでにアポトーシスシグナルを受けながら膜リン脂質の変化が起こる以前の細胞が末梢血中存在すれば、短期間の試験管内培養中にアポトーシスが進行、膜表面へのPSの表出が起こり、さらに細胞サイズの減少とPIの取り込みが観察されることが予測される。試験管内培養系ではこのような細胞の貪食や消失が急速に起こることはないと考えられ、アネキシンV結合細胞として検出される可能性が高い。伝染性単核症のリンパ球を用いた検討では、短期間培養により、前方散乱がなく、PI結合性がないにも関わらずアネキシンVを強く結合する細胞が確認された。さらに単離した細胞の形態学的特徴から、このような細胞が短時間でアポトーシスに至る細胞であることが示された。

急性発熱性疾患患児の末梢血リンパ球を用いた場合、短時間

培養後に明らかなアネキシンV結合細胞が出現しており、これらの患者では末梢血中に比較的多数のアポトーシス指向性細胞が存在することが示された。しかし、その程度は12時間培養後でもせいぜい10~20%が圧倒的に多く、伝染性単核症と異なりごく一部のリンパ球のみがアポトーシスを起こしていることが示唆された。一方、正常対照では培養後のアポトーシスは殆ど観察されないことから、このようなリンパ球の出現は試験管内培養に伴う非特異的現象ではなく、抗原刺激などのリンパ球活性化に特徴的な所見であると考えられた。

細菌感染症とウイルス感染症とに分類し検討できた一部の症例では、双方ともにB細胞にアポトーシス指向性リンパ球が多数含まれていることが明らかになった。B細胞は活性化の指標となる表面抗原が殆どなく、短期培養におけるアネキシンV結合性の発現は生体内におけるB細胞活性化の指標として有用となる可能性がある。また、ウイルス感染症では細菌感染症に比し明らかにT細胞のアポトーシス指向性が亢進していた。アネキシンV結合細胞の殆ど大部分がB細胞であり、NK細胞が殆ど認められないことは、前者がリンパ節内で多数を占め、後者がリンパ節内に殆ど存在しないことを反映していると考えられる。したがって、急性発熱性疾患におけるリンパ球のアネキシンV結合性は、リンパ節など感染病原体の侵入局所における抗原特異的リンパ球の活性化を反映していると考えられる。その場合、アポトーシス指向性リンパ球の多くは活性化リンパ球表面形質を有していることが予想される。三重蛍光標識法の結果で示すように、アネキシンV結合を示すTリンパ球の殆どはCD45RO陽性であり、弱いながらHLA-DR発現も増強していることが示された。従って、末梢血中に認められるアポトーシス指向性T細胞の大部分は、何らかの要因で生体内で活性化されたT細胞であることが強く示唆された。Akbarら<sup>27)28)</sup>は、EBVや水痘帯状疱疹ウイルス(varicella zoster virus, VZV)感染症において末梢血リンパ球のbcl-2発現とアポトーシスとの関連を検討、これらのウイルス感染症においてはリンパ球のbcl-2発現の低下と密接に関連してアポトーシスが亢進していると報告している。またこれらの細胞がCD45RO陽性のメモリーT細胞であること、アポトーシス細胞の多くがCD8陽性T細胞であることを明らかにしている<sup>27)</sup>。しかし、彼らの検討は従来の形態学的変化などを指標としたアポトーシスの評価であり、またEBVやVZV以外のウイルス感染症に関する検討や、細菌感染症に関する検討は記載されていない。また、B細胞のアポトーシスについても検討されていない。

抗原刺激により活性化されたリンパ球のアポトーシスの誘導に関して、現在2つの機序が想定されている。一つは活性化後細胞周期に入ったリンパ球が再び抗原刺激を受けることにより細胞死が誘導される、活性化による細胞死(activation-induced cell death, AICD)であり、もう一つはサイトカインの枯渇による細胞死である。後者の場合はbcl-2発現低下によるアポトーシス感受性の亢進が示されており、適切なサイトカインを外から補充することによりbcl-2発現は増強、細胞死が抑制される。Sekiら<sup>29)</sup>、宮脇ら<sup>30)</sup>は、放射線照射などにより誘導されたアポトーシスが、リンパ球亜群により異なるサイトカイン添加により抑制されることを報告している。このような試験管内の実験系では、アポトーシスの誘導刺激と同時にサイトカインが添加されており、またすべての細胞が同時にアポトーシスの誘導シグナルを受けている。しかし、実際の感染症においては発熱な

どの臨床症状を認めて末梢血を採取した時期が、アポトーシスシグナル、すなわち感染の成立時期とどの程度ずれているかは多様で、症例により極めて差が大きいことが推定される。さらに症例により抗原刺激の濃度や局所でのサイトカイン産生濃度、抗原刺激に関わる補助細胞の機能など、複雑な抗原刺激微小環境のバランスが異なり、これによりアポトーシス指向性が決定されると考えられる。したがって、これらの症例でのリンパ球のアポトーシス指向性に対するサイトカインの影響も多様であることが予測される。本研究で得られた結果もそのような推定を支持するものである。特にアポトーシス指向性の強いCD8陽性T細胞やB細胞では一部の症例において有意なアポトーシス抑制が観察されたが、全くIL-2やIL-4添加の影響が観察されない症例も数多く存在した。さらに、CD4陽性T細胞はもとアポトーシス指向性が強くなく、サイトカイン添加の影響の評価も困難であった。B細胞は殆どの症例でIL-2、IL-4の添加でアポトーシスが抑制されおり、この細胞が急性感染症においては活発に増殖し、末梢血中には種々の段階でアポトーシスにコミットされた(方向づけられた)細胞が混在しているということが示唆された。通常の感染症では末梢血中B細胞が著明に減少する現象は観察されず、急性感染症においてはリンパ節におけるB細胞の急激な増殖と末梢血の流出が持続的に起こり、アポトーシスにより排除される細胞と新たに流出する細胞の均衡がとれていることを示唆する。一方、ウイルス感染症などでしばしば観察されるリンパ球減少、特にT細胞の比較的減少はT細胞の活性化とアポトーシスの亢進を反映していると考えられる。おそらくT細胞の場合にはB細胞ほど著明な細胞分裂は起こらず、末梢血中のT細胞減少が起こりやすいと考えられる<sup>31)32)</sup>。

未感染者に対するワクチン接種により、このような臨床症例での複雑な抗原刺激状況を多少整理し、抗原刺激後のナイーブT細胞の活性化とアポトーシス誘導に関して単純化したモデルを提供してあげることが期待される。今回のウイルスワクチン接種は、事前に抗体価が陰性の未感作症例を選んでおり、反応し活性化されるリンパ球は主として未感作のナイーブ細胞が中心となると考えられる。今回の検討では主としてB細胞に、また一部の例ではCD8陽性T細胞に明らかなアネキシンV結合性が誘導されており、極めて短期間の内にリンパ球の活性化とアポトーシス指向性が決定されることが示唆された。抗原刺激微小環境においては、抗原刺激に関連のないところにおいてのサイトカイン産生によるメモリーT細胞の抗原非特異的活性化と増殖が起こることが報告されている<sup>33)</sup>。したがって、急性感染症の検討では、多様なサイトカイン産生により二次的に活性化されたリンパ球がアポトーシスに誘導される可能性を否定出来ない。しかし、ワクチン接種によるアポトーシス指向性リンパ球の出現は接種後極めて短時間のうちに検討されており、これらのサイトカインの影響は否定的であると考えられる。マウスモデルなどを用いた検討では、ウイルス抗原刺激後の抗原非特異的T細胞の活性化は早くとも2~3日後から観察されており、また、ウイルス感染後のポリクローナルなT細胞反応において、このような抗原非特異的な活性化は影響が弱く、むしろ抗原特異的活性化の影響の方が重要であるとする報告もある<sup>34)</sup>。今回の研究で示されたリンパ球のアポトーシス指向性は、抗原刺激環境下でのリンパ球活性化を比較的忠実に反映していると考えられる。

以上、アネキシンV結合によるアポトーシス指向性リンパ球の検討は、生体内でのリンパ球活性化の新たな指標として極めて有用である可能性が示された。特に、今回検討の対象となった急性発熱性疾患のみでなく、リンパ球亜群の一部が活性化するあらゆる病態において、同様のアポトーシス指向性の亢進が観察される可能性が考えられる。すなわち、リンパ球活性化機序が病態に関与するある種の自己免疫性疾患や、スーパー抗原刺激に伴う特定のT細胞レパトリーの活性化などの解析や病態評価には威力を発揮することが予想される。今後さらに種々の病態におけるアポトーシス指向性リンパ球の出現を経時的に検討するとともに、可能な症例ではこれらのリンパ球に特定の抗原特異性を有するリンパ球集団が濃縮されているか否かについて検討する必要がある。

## 結 論

小児の急性感染症における末梢血アポトーシス指向性リンパ球の評価をアネキシンV結合法を用いて行い、以下の結論を得た。

1. 短期間、試験管内培養によりアネキシンV結合を誘導することにより、形態的变化を起こす以前の、アポトーシス早期のリンパ球を鋭敏に検出することが出来た。
2. 急性感染症において、末梢血リンパ球を短期培養することによりアネキシンV結合細胞の出現が認められた。正常対照においてこのような細胞は殆ど認められず、アポトーシス指向性リンパ球の検出は急性感染症に特徴的と考えられた。
3. ウイルス感染症、細菌感染症のいずれにおいてもアポトーシス指向性リンパ球の大部分はB細胞であった。しかし、ウイルス感染症においてはT細胞の一部に明らかなアネキシンV結合性が観察された。
4. アネキシンVを結合するT細胞のほとんどはCD45ROならびにHLA-DRの活性化抗原を発現し、急性感染症におけるアポトーシス指向性T細胞はその殆どが活性化リンパ球であることが示された。
5. 急性感染症において、IL-2ならびにIL-4のアポトーシスに対する影響は多様であったが、一部の症例ではCD8陽性細胞やB細胞における著明なアポトーシス抑制が認められた。
6. 弱毒生ウイルスワクチン接種において、接種後24時間で大部分の症例で主としてB細胞の一部にアネキシンV結合性が確認された。T細胞におけるアネキシンV結合性も増加傾向を示した。

以上の結果より、アネキシンV結合によるアポトーシス指向性リンパ球の検出は、リンパ球活性化の新たな指標として極めて有用であると考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師小泉晶一教授に深く感謝の意を表します。また、終始直接御指導、御協力を頂きました金沢大学医学部保健学科谷内江昭宏教授に心から深謝致します。また多大なるご協力を頂きました金沢大学医学部医学科小児科学講座第二研究室の皆様へ深謝致します。尚、本研究の一部は第25回日本臨床免疫学会(1997, 東京)及び第27回日本免疫学会総会(1997, 札幌)において発表された。

## 文 献

- 1) Akbar AN, Salmon M, Savill J, Janossy G. A possible role

for *bcl-2* in regulating T-cell memory- a 'balancing act' between cell death and survival. *Immunol Today* 14: 526-532, 1993

2) Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 149: 4029-4035, 1992

3) Miyawaki T, Kasahara Y, Kanegane H, Ohta K, Yokoi T, Yachie A, Taniguchi N. Expression of CD45RO (UCHL1) by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells as a sign of *in vivo* activation in infectious mononucleosis. *Clin Exp Immunol* 83: 447-451, 1991

4) Uehara T, Miyawaki T, Ohta K, Tamaru Y, Yokoi T, Nakamura S, Taniguchi N. Apoptotic cell death of primed CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes in Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. *Blood* 80: 452-458, 1992

5) Waele MD, Thielemans C, Van Camp BKG. Characterization of immunoregulatory T cells in EBV-induced infectious mononucleosis by monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 304: 460-462, 1981

6) Tomkinson BE, Wagner DK, Nelson DL, Sullivan JL. Activated lymphocytes during acute Epstein-Barr virus infection. *J Immunol* 139: 3802-3807, 1987

7) Tamaru Y, Miyawaki T, Iwai K, Tsuji T, Nibu R, Yachie A, Koizumi S, Taniguchi N. Absence of *bcl-2* expression by activated CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes in acute infectious mononucleosis supporting their susceptibility to programmed cell death. *Blood* 82: 521-527, 1993

8) Donnemberg AD, Margolick JB, Donnemberg VS. Lymphopoiesis, apoptosis, and immune amnesia. *Ann N Y Acad Sci* 770: 213-226, 1995

9) Borrego F, Pena J, Solana R. Regulation of CD69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinases. *Eur J Immunol* 23: 1039-1043, 1993

10) 新谷尚久. 乳幼児におけるヒトヘルペスウイルス-6 (HHV-6) 初感染の臨床免疫学的研究. 十全医会誌 104: 132-142, 1995

11) Cabrera ML., Santis AG, Ruiz EF, Blacher R, Esch F, Mateos PS, Madrid FS. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med* 178: 537-547, 1993

12) Razvi ES, Welsh RM, McFarland HI. *In vivo* state of antiviral CTL precursors: characterization of a cycling cell population containing CTL precursors in immune mice. *J Immunol* 154: 620-632, 1995

13) Salmon M, Pilling D, Borthwick NJ, Viner N, Janossy G, Bacon PA, Akbar AN. The progressive differentiation of primed T cells is associated with an increasing susceptibility to apoptosis. *Eur J Immunol* 24: 892-899, 1994

14) Castedo M, Macho A, Zamzami N, Hirsch T, Marchetti P, Uriel J, Kroemer G. Mitochondrial perturbations define lymphocytes undergoing apoptotic depletion *in vivo*. *Eur J*

*Immunol* 25: 3277-3284, 1995

15) Petit PX, Lecoecur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 130: 157-167, 1995

16) Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 183: 1533-1544, 1996

17) Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, van Oers MHJ. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cell undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-1420, 1994

18) Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272: 26159-26165, 1997

19) Martin SJ, Reutelingsperger CPM, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RCAA, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of *bcl-2* and Abl. *J Exp Med* 181: 1545-1556, 1995

20) O'Brien IEW, Reutelingsperger CPM, Holdaway KM. Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. *Cytometry* 29: 28-33, 1997

21) Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *BioTechniques* 23: 525-530, 1997

22) Van Engeland M, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 24: 131-139, 1996

23) Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51, 1995

24) Sutkowski N, Palkama T, Ciurli C, Sekaly RP, Thorley-Lawson DA, Huber BT. An Epstein-Barr virus-associated superantigen. *J Exp Med* 184: 971-980, 1996

25) Yachie A, Miyawaki T, Uwadana N, Ohzeki S, Taniguchi N. Sequential expression of T cell activation (Tac) antigen and Ia determinants on circulating human T cells after immunization with tetanus toxoid. *J Immunol* 131: 731-735, 1983

26) Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148: 2207-2216, 1992

27) Akbar AN, Borthwick N, Salmon M, Gombert W, Boffill M, Shamsadeen N, Pilling D, Pett S, Grundy JE, Janossy G. The significance of low *bcl-2* expression by CD45RO T cells in normal individuals and patients with acute viral infections. The role of apoptosis in T cell memory. *J Exp Med* 178: 427-438, 1993

28) Akbar AN, Salmon M. Cellular environments and

apoptosis: tissue microenvironments control activated T-cell death. *Immunol Today* 18: 72-76, 1997

29) Seki H, Iwai K, Kanegane H, Konno A, Ohta K, Ohta K, Yachie A, Miyawaki T, Taniguchi N. Differential protective action of cytokines on radiation-induced apoptosis of peripheral lymphocyte subpopulations. *Cell Immunol* 163: 30-36, 1995

30) 宮脇利男, 谷口 昂, 関 秀俊, 金兼弘和, 谷内江昭宏. 末梢血リンパ球亜群の放射線誘導プログラム細胞死. 厚生省特定疾患免疫不全症候群調査研究班 平成5年度研究報告書別冊 48-51, 1993

31) Razvi ES, Jiang Z, Woda BA, Welsh RM. Lymphocyte apoptosis during the silencing of the immune response to acute

viral infections in normal, *lpr*, and *bcl-2*-transgenic mice. *Am J Pathol* 147: 79-91, 1995

32) Ito M, Watanabe M, Kamiya H, Sakurai M. Herpes simplex virus type I induces apoptosis in peripheral blood T lymphocytes. *J Infect Dis* 175: 1220-1224, 1997

33) McInnes IB, Liew FY. Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. *Immunol Today* 19: 75-79, 1998

34) Zarozinski CC, Welsh RM. Minimal bystander activation of CD8 T cells during the virus-induced polyclonal T cell response. *J Exp Med* 185: 1629-1639, 1997

**A Novel Indicator of Lymphocyte Activation in Acute Infections: Detection of Apoptosis-Committed Lymphocytes by Annexin V Binding Assay** Koji Nunogami, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, 107, 263 — 275 (1998)

**Key words** acute infection, lymphocyte activation, apoptosis, annexin V

#### Abstract

Antigen-specific activation of lymphocytes takes place within the peripheral lymphoid organs. The activated lymphocytes proliferate and differentiate within the microenvironment and are further recruited to the periphery to exert their effector functions. The majority of these cells, however, undergo apoptosis, and are rapidly cleared from the circulation by phagocytic cells. It is thus rare to detect activated lymphocytes within peripheral blood as an indicator of in-vivo antigenic challenge. In this study, "apoptosis-committed lymphocytes" were identified by annexin V binding assay. Annexin V binds specifically to phosphatidyl serine (PS) which is exposed on the cell surface at an early phase of the apoptotic process. Apoptosis-committed lymphocytes were not distinguishable from normal lymphocytes before culturing; they showed normal forward light scatter and they did not bind propidium iodide (PI). However, PS was characteristically expressed on the cell surface after brief in-vitro culturing and exhibited strong binding of fluorescein isothiocyanate-conjugated annexin V. Freshly isolated lymphocytes, whether from normal controls or from patients with acute infectious diseases, did not bind annexin V. However, a significant fraction of lymphocytes from the acute infection patients exhibited strong binding annexin V after being culture. In contrast, lymphocytes from normal controls did not bind annexin V even after culturing, suggesting that the appearance of apoptosis-committed lymphocytes is characteristic of acute infections. The majority of the annexin V-binding lymphocytes were B cells both in bacterial and viral infections. A smaller, but still significant fraction of T cells also bound annexin V in viral infections. Natural killer (NK) cells did not show any annexin V binding. Most of the annexin V-binding T cells expressed HLA-DR and CD45RO on their cell surfaces, indicating that these T cells are activated in-vivo. Addition of IL-2 or IL-4 exhibited a variable effect on apoptosis, but annexin V binding of B cells and CD8<sup>+</sup> T cells was markedly inhibited in some cases. Apoptosis-committed lymphocytes were detectable 24 hours after injection of live-attenuated virus immunization. Significant fractions of B cells and small fractions of T cells bound annexin V after in-vitro culturing. These results indicated that annexin V binding of apoptosis-committed lymphocytes directly reflects in-vivo activation of lymphocytes after antigen stimulation. This assay may thus provide a novel and much more sensitive indicator of lymphocyte activation than conventional cell surface analysis.