

Antigen-Specific Helper T cell Activity in Man after Primary Immunization with Tetanus Toxoid

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/2297/8060

破傷風トキソイド初回免疫後の抗原特異的ヘルパーT細胞活性

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

岩 淵 邦 芳

(昭和63年8月23日受付)

In vivo における抗原特異的抗体産生のメカニズムを明らかにする目的で、破傷風トキソイド (tetanus toxoid, TT) 初回免疫後の健康成人の末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), T細胞, non T細胞を用い, in vitro での抗原特異的抗体産生のT細胞依存性, およびT細胞の抗原特異的ヘルパー活性について経時的に検討した。破傷風感染の既往およびTTワクチン接種歴のない健康成人5例に対しTTワクチンを接種した後経時的にPBMC, 末梢血T細胞, non T細胞を採取した。PBMC, non T細胞によるTT抗原特異的抗体産生, およびT細胞をTT抗原特異的記憶B細胞を含むnon T細胞に加えてのTT抗原特異的抗体産生を検討した。培養はTT抗原添加あるいは無添加の系で行い, 4日間培養後上清を採取し(4日目上清), 培養細胞を洗浄後TT抗原を添加しないでさらに8日間培養を継続した後上清を採取した(12日目上清)。上清中のイムノグロブリンG (immunoglobulin G, IgG) 抗TT抗体を酵素結合免疫吸着法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) を用いて測定した。免疫前のPBMC, non T細胞による4日目上清中, 12日目上清中のIgG抗TT抗体産生は認められなかったが, 免疫後には全例でIgG抗TT抗体産生が認められた。4日目上清中のIgG抗TT抗体産生は, 培養液中のTT抗原および自己T細胞の存在の有無にかかわらず認められたが, 6週目以降の12日目上清中のIgG抗TT抗体産生は, 培養液中にTT抗原および自己T細胞が存在する場合にのみ認められた。又12日目上清中のIgG抗TT抗体産生は, TT抗原特異的記憶B細胞を含むnon T細胞へ初回免疫後の自己T細胞を加えた場合には認められたが, 同じnon T細胞に初回免疫前の自己T細胞を加えた場合には認められなかった。さらに, 同じnon T細胞と経時的に採取した自己T細胞との培養では, 初回免疫後1~3週目以降の自己T細胞を加えた場合にのみIgG抗TT抗体産生が認められた。抗体産生量は経時的に変動したが, PBMCによるIgG抗TT抗体産生量の変動とは一致しなかった。これらの所見より, 抗原非依存性のIgG抗TT抗体産生はT細胞非依存性であるが, 抗原依存性のTT抗原特異的記憶B細胞による抗体産生はTTでの初回免疫後のT細胞依存性である事が明らかとなった。さらに抗原特異的ヘルパーT細胞活性は, 初回免疫前には認められず, 免疫後1~3週目より出現し経時的な変動を示すことが明らかとなった。

Key words primary immunization, tetanus toxoid, IgG anti-tetanus toxoid antibody, antigen-specific helper T cell activity

In vitro における抗体産生に関する解析には, これまで主として非特異的刺激であるポーク・ウィードマイトジェン (pokeweed mitogen, PWM) によって多クローン性抗体産生を誘導する系を用いて行われてきた。破傷風トキソイド (tetanus toxoid, TT) に

対する in vitro 抗体産生についても, この PWM 誘導抗体産生系を用いた研究が数多く報告されている^{1)~9)}。しかし, PWM 添加培養系では PWM が非特異的な抗原刺激として作用するため, 得られる結果は多クローン性抗体産生の一部としての抗 TT 抗体

Abbreviations: AET, 2-amino-ethylisothiuronium bromide; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FCS, fetal calf serum; IgG, immunoglobulin G; KLH, keyhole limpet hemocyanin; OD, optical density; PBMC, peripheral blood mononuclear cells;

産生を反映することになり、抗原特異的抗体産生の評価は困難であった。そこで、PWM を用いずに TT などの特異的抗原刺激を利用する抗原特異的抗体産生系が近年確立されてきた⁹⁻¹⁴。

最近 Lum ら¹⁵⁻¹⁷、Shiobara ら¹⁸は、in vitro 抗体産生の培養法に改良を加え、培養開始後4日目に上清中から一旦抗原を除去することにより、追加免疫を必要とすることなく、免疫された正常人の83%以上に in vitro TT 抗原特異的抗体産生を検出し得ることを明らかにした。大塚ら^{19,20}はこの in vitro 抗体産生系を用いて、TT による初回免疫後の in vivo の TT 抗原特異的抗体産生および in vitro における末梢血液中の TT 抗原特異的抗体産生細胞の動態について研究し、TT による初回免疫後自然に IgG 抗 TT 抗体を産生する B 細胞が血清抗体価が陽性を示す時期に一致して末梢血液中を循環しており、TT 抗原特異的記憶 B 細胞は自然に IgG 抗 TT 抗体を産生する B 細胞と同時か、又はその消失よりやや遅れて末梢血液中を循環していることを明らかにした。

一方抗原特異的ヘルパーT細胞活性の動態については、TT 抗原特異的記憶B細胞を含む末梢血液中の non T 細胞による特異的抗体産生を指標にして検討されている^{21,22}。しかしこれらは PWM 刺激による抗体産生系を用いたもので、特異的抗原刺激により誘導される抗原特異的ヘルパーT細胞活性についての報告は少なく²³、さらに、初回免疫前後での抗原特異的抗体産生に対する抗原特異的ヘルパーT細胞活性の動態は未だ不明である。

そこで著者は、TT ワクチンの接種歴のない健康成人を対象とし、TT 初回免疫後の in vitro における末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) による抗原特異的抗体産生の T 細胞依存性を検討し、さらに、初回免疫前後の末梢血液中 T 細胞の抗原特異的ヘルパー活性を、T 細胞依存性に抗原特異的抗体産生を行う non T 細胞に及ぼす影響を指標として検討した。

対象および方法

I. 対象

破傷風の感染既往および TT ワクチン接種歴のない健康成人5名(男性5名、年齢20~28歳)を TT 初回接種の対象とした。

II. 免疫方法

対象5名(Case1~5)に対して TT ワクチン(沈降破傷風トキソイド, Lot No. 405-0)(武田薬品, 大阪)0.5ml を筋肉内に接種した。接種日を0週目とし、その後1週目、3週目に初回接種と同様の方法で追加接種を行った。又、TT 抗原特異的記憶B細胞を豊富に含む non T 細胞分画を得る目的で、初回接種後28週目にさらに追加接種を行った²⁴。

III. PBMC の採取および、細胞分離

末梢血の採取は初回接種前および初回接種後11週まで毎週1回行い、Case 4, 5 では、その後2~3週間隔で18週目まで行った。TT 抗原特異的記憶B細胞を豊富に含む non T 細胞分画を得る目的で28週目に追加接種を実施し、その2又は3週後にも採血を行った。PBMC はヘパリン加末梢血より Ficoll-Hypaque 比重遠心法を用いて分離した²⁵。末梢血は同量の RPMI 1640 培養液 (GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.) で希釈し、15ml のプラスチック遠心管 (Falcon No. 2097) (Becton Dickinson, New Jersey, U.S.A.) を用い、リンホブレップ (Nycomed AS, Oslo, Norway) 1容に対して希釈された末梢血2容の比率でリンホブレップ上に静かに重層し、室温で35分間、600×g で遠心した。遠心後中間層の細胞を採取し、混入する抗 TT 抗体を除去するために RPMI 1640 培養液で6回洗浄した後、ストレプトマイシンを 0.1g/l、ペニシリンGを 50,000U/l、非動化牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (GIBCO) を10%添加した RPMI 1640 培養液(培養液)に浮遊させ PBMC とした。PBMC から T 細胞、non T 細胞への分画は、2-amino-ethylisothiouonium bromide (AET) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, U.S.A.) 処理のヒツジ赤血球²⁶とのロゼット形成法により行った²⁰。PBMC は 50ml のプラスチック遠心管 (Falcon No. 2070) を用いて非動化 FCS を20%添加した RPMI 1640 培養液で10⁷/ml の濃度に調整し、非動化 FCS を20%添加した RPMI 1640 培養液に浮遊してある AET 処理ヒツジ赤血球を PBMC の100倍の細胞数加えた後、4°C 100×g で5分間遠心した。遠心後さらに1時間4°C に保った後、ゆるやかに沈渣をほぐし、冷却したリンホブレップに PBMC 分離の場合と同様に重層し、4°C で35分間、600×g で遠心した。中間層の細胞を採取し、非動化 FCS を10%添加した RPMI 1640 培養液で3回洗浄した後、培養液に浮遊させ non T 細胞分画とした。

沈渣は0.83%の塩化アンモニウム溶液²⁾ 1 ml を加えヒツジ赤血球を溶血させ、非動化 FCS を10%添加した RPMI 1640 培養液で3回洗浄した後、培養液に浮遊させ T細胞分画とした。T細胞分画のエロゼット形成率は95%以上、non T細胞分画へのエロゼット形成細胞の混入は5%以下であった。non T細胞分画への非特異的エステラーゼ染色陽性細胞の混入は40~60%であった。

IV. 細胞の凍結保存および解凍

細胞の凍結保存は、非動化 FCS を20%、およびジメチルスルフォオキサイド(和光純薬, 大阪)を10%添加し冷却した RPMI 1640 培養液で1~2×10⁷/mlの濃度に調整された細胞を1ml ずつ細胞保存用チューブ(Wheaton Cryule vial)(WHEATON Scientific, New Jersey, U.S.A.)に分注し、プログラムフリーザー(microcomputerized program freezer, FFP 210)(大阪酸素, 守山)を用いて、-40°Cまでは-1.0°C/min, -40°Cから-80°Cまでは、-3.0°C/minの速度で凍結し、直ちに液体窒素中に保存した。細胞の解凍は、凍結細胞を37°Cの恒温槽にて急速に解凍した後、非動化 FCS を50%添加し冷

却した RPMI 1640 培養液にて緩徐に希釈し、2回洗浄した後に培養液に浮遊させた。解凍後の生細胞率は、トリパンブルー色素排泄法にて70%以上であった。

V. In vitro イムノグロブリン G (immunoglobulin G, IgG) 抗 TT 抗体産生

In vitro おける TT 抗原刺激による IgG 抗 TT 抗体産生は Lum ら¹⁵⁾の方法を用いた。細胞は培養液に浮遊させ、PBMC は6×10⁵/well, T細胞は7×10⁵/well, non T細胞は2×10⁵/wellの濃度で、U型マイクロプレート(Nunc lon Delta)(Nunc, Roskilde, Denmark)に200μl ずつ単独で、あるいはあらかじめ予備実験で確認した至適量の TT 抗原(Division of Biologic Laboratories, Commonwealth of Massachusetts Department of Public Health, Boston, MA, U.S.A.) 25ng/ml を添加して、それぞれ6穴ずつ分注し、37°C, 100%湿度, 5% CO₂ in air の条件下で培養した。T細胞と non T細胞の混合培養を行う場合も、T細胞, non T細胞の濃度はそれぞれ7×10⁵/well, 2×10⁵/wellとした。培養4日目に培養上清(4日目上清)を採取し、ウェル内に

Table 1. Serial study of IgG anti-TT antibody production in the supernatants of 4-day cultures of PBMC with or without TT antigen¹⁾

Case	Presence of TT antigen in culture	Concentration (ng/ml) of IgG anti-TT antibody produced in 6 cultures of PBMC ²⁾ tested															
		Weeks after the initial vaccination with TT antigen															
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15	18			
1	+	2.6 ±0.6	218.6 ±143.9	70.5 ±21.1	3.8 ±1.9	3.6 ±1.6	1.5 ±1.7	0	0	1.2 ±0.9	0	nt ³⁾	nt	nt			
	-	2.2 ±0.4	381.2 ±268.7	72.9 ±50.6	10.3 ±4.3	nt	1.3 ±1.1	0	0	2.2 ±0.6	0	nt	nt	nt			
2	+	75.6 ±11.3	97.7 ±43.1	108.4 ±47.2	26.3 ±4.0	0	3.8 ±2.9	0	0.7 ±1.6	0	0	nt	nt	nt			
	-	90.2 ±8.5	85.9 ±20.5	165.3 ±89.8	42.5 ±9.7	nt	2.0 ±1.6	0	0.5 ±1.1	0	0	nt	nt	nt			
3	+	8.0 ±3.0	12.3 ±1.3	nt	3.7 ±1.1	1.4 ±1.2	0	0	0	0	0	0	nt	nt	nt		
	-	12.0 ±4.2	16.8 ±2.9	nt	4.7 ±1.3	2.5 ±2.2	0	0	0	0	0	0	nt	nt	nt		
4	+	147.1 ±24.4	334.7 ±46.3	6.8 ±2.3	1.2 ±1.9	0	3.4 ±3.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-	184.8 ±48.8	342.8 ±34.9	12.7 ±1.9	7.4 ±2.6	0	9.7 ±6.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	+	0	16.6 ±5.8	282.5 ±53.1	0	3.6 ±3.1	0.3 ±0.7	0	0	0	0	0	0	0	nt	0	
	-	0	40.2 ±10.9	349.1 ±38.1	0	2.9 ±2.6	1.7 ±1.6	0	0	0	0	0	0	0	nt	0	

1) The concentrations (ng/ml) of IgG anti-TT antibody are shown as mean ± S.D. from 6 wells cultured.

2) PBMC=peripheral blood mononuclear cells

3) nt=not tested

残った細胞を RPMI 1640 培養液で 3 回洗浄して培養液内の TT 抗原を除去後、培養液を新たに加えた。その後のさらに 8 日間培養を継続し、培養終了後その上清 (12 日目上清) を採取した。採取した上清は測定時まで -20°C で凍結保存した。

VI. IgG 抗 TT 抗体価の測定

上清中の IgG 抗 TT 抗体価は Lum ら¹⁹⁾の方法に準じて酵素結合免疫吸着法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) によって測定した。まず、pH 9.6 の 0.05M 炭酸緩衝液で $5\ \mu\text{g/ml}$ の濃度に調整した TT 抗原を $100\ \mu\text{l}$ づつ平底マイクロプレート (Immunoplate I) (Nunc) に加え、これを 37°C で 24 時間放置しプレートの表面に抗原を吸着させた。次いで、0.05% Tween 20 (Sigma) を添加した pH 7.2、浸透圧 280 mOsm/kg のリン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline-Tween, PBS-Tween) でプレートを 3 回洗浄し、10% 牛血清アルブミン (Sigma) を添加したリン酸緩衝食塩水を $100\ \mu\text{l}$ づつ加えて 37°C で 2 時間反応させた。反応終了後 PBS-Tween で 3 回洗浄し、これを測定用プレートとして測定時まで -20°C で凍結保存した。

培養上清 $100\ \mu\text{l}$ を測定用プレートに加えて 37°C で 2 時間反応させた後、PBS-Tween で 3 回洗浄した。次いで 2 次抗体として pH 7.1 の 10 mM リン酸緩衝液で 1:1500 に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (TAGO, Inc., Burlingame, CA, U.S.A.) を $100\ \mu\text{l}$ 加えて 37°C で 1 時間反応させた。反応終了後プレートを PBS-Tween で 3 回洗浄し、過酸化水素水を 0.03% 添加した pH 4.0 の 0.1M クエン酸緩衝液に 2, 2'-azinodi-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) (Sigma) を $1.0\ \text{g/l}$ の濃度に溶解させた溶液を $100\ \mu\text{l}$ づつ加えた。室温で 30 分間反応させた後、ただちにその呈色反応の吸光度 (optical density, OD) を吸光度計 (EIA reader Model 2550) (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, U.S.A.) を用いて波長 405 nm で測定した。なお、上清中の IgG 抗 TT 抗体の絶対量は各測定プレートごとにアニティ・カラムで精製した既知濃度の IgG 抗 TT 抗体 (Dr. L. G. Lum より供与) の希釈系列を加え、それより得られた標準曲線から求めた。本法の測定下限値は $1.6\ \text{ng/ml}$ であり、測定下限値以上の OD を示すものを *in vitro* IgG 抗 TT 抗体産生陽性と判断した。

VII. 統計学的検討

二群の平均値の差の検定は等分散性の検定の後 Student 又は、Welch の t 検定で行った。多群間の

平均値の差の検定は、一元配置分散分析後 Duncan の多重比較法²⁰⁾で行った。 $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。

成 績

I. TT ワクチン未接種時の *in vitro* IgG 抗 TT 抗体産生

TT ワクチン接種前の PBMC の TT 抗原添加および無添加の培養で得られた 4 日目上清中、12 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生は 5 例とも測定下限値以下であった。又、T 細胞、non T 細胞分画の TT 抗原添加および無添加の培養で得られた 4 日目上清中、12 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生も同様に測定下限値以下であった。

II. TT ワクチン接種後の *in vitro* IgG 抗 TT 抗体産生

1. PBMC による 4 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生

表 1 に TT ワクチン接種後の PBMC による 4 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生の経時的变化を示す。4 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体の産生は、培養系への TT 抗原添加の有無にかかわらず認められた。又 6 ウェルの平均値で比較した IgG 抗 TT 抗体の産生量は TT 抗原を添加した培養でも有意な増加を認めなかった。各例ごとに IgG 抗 TT 抗体産生の認められる時期を比較すると TT 抗原添加の有無にかかわらず検討した全例で一致していた。

今回検討した 5 例については初回接種後 2~3 週目で IgG 抗 TT 抗体が上清中に検出されるようになり、3~4 週目に最高の抗体産生を示した。一方 IgG 抗 TT 抗体が検出される期間は各例ごとに差を認めたものの、全例 7~11 週目には消失した。Case 1, 2, 4, 5 では、一旦 IgG 抗 TT 抗体が検出されなくなり、1~3 週後に再び検出されるようになった。

2. non T 細胞による 4 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生

4 日目上清中の *in vitro* IgG 抗 TT 抗体産生における T 細胞依存性の有無を明らかにする目的で、PBMC と、分画後の T 細胞、non T 細胞を用いて、4 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体の産生を検討した。図 1 に代表例を示す。PBMC による IgG 抗 TT 抗体の産生は TT 抗原添加の有無にかかわらず認められ、産生量も TT 抗原の添加により増加がみられなかった。IgG 抗 TT 抗体の産生は T 細胞のみでは認められなかったが、non T 細胞のみでは TT 抗原添

加の有無にかかわらず認められた。また、抗体の産生量も TT 抗原の添加により有意な増加がみられなかった。表 2 に全例の実測値を示したが、いずれも同様の結果が得られた。

表 3 に non T 細胞による 4 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生の経時的変化を示す。4 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体の産生は培養系への TT 抗原添加の有無にかかわらず認められ、産生量も TT 抗原の添加により有意な増加がみられなかった。

IgG 抗 TT 抗体産生の認められる時期を TT 抗原添加の有無で比較すると全例で TT 抗原の添加の有無にかかわらず一致していた。さらに各例ごとに PBMC による 4 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生の経時的変化と比較すると抗体産生の認められる時期は一致していた。

以上の結果から 4 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生は TT 抗原非依存性であった T 細胞非依存性であると考えられた。

3. PBMC による 12 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生

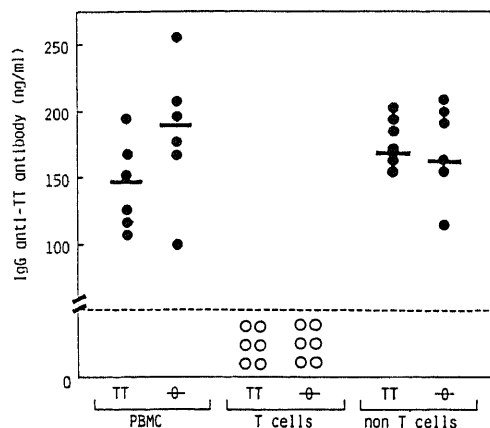


Fig. 1. Antigen and T cell independency of IgG anti-TT antibody production in the 4-day supernatants. Various cultures studied are shown on the horizontal axis. PBMC, TT and \ominus denote peripheral blood mononuclear cells, cultures with TT antigen and cultures without TT antigen, respectively. PBMC, T cells and non T cells contained 6×10^5 cells, 7×10^5 cells and 2×10^5 cells, respectively. Each circle represents the concentration of IgG anti-TT antibody (ng/ml) produced after 4-day of culture. Closed circles and open circles represent positive and negative wells, respectively. The geometric means are indicated by the \blacksquare .

表 4 に TT ワクチン接種後の PBMC による 12 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生の経時的変化を示す。TT 抗原を添加した培養系では、各例ごとに抗体の産生時期に差は認められたものの、IgG 抗 TT 抗体は変動を示しながら初回免疫後 11~18 週目まで産生された。

TT 抗原を添加しない培養系では IgG 抗 TT 抗体の産生は 4~5 週目まで認められたがそれ以後は認められなかった。

4. non T 細胞による 12 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生

PBMC が TT 抗原依存性に IgG 抗 TT 抗体産生を行う時期について、12 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生の T 細胞依存性の有無を明らかにする目的で、PBMC と、分画後の T 細胞、non T 細胞を用いて、12 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体の産生を検討した。図 2 に代表例を示す。PBMC による IgG 抗 TT 抗体の産生は、TT 抗原を添加した培養にのみ認められ、T 細胞または、non T 細胞のみでは TT 抗原添加の有無にかかわらず、IgG 抗 TT 抗体の産生は認められなかった。表 5 に全例の実測値を示すが、全例で同様の結果が認められた。

以上より 6 週目以降の PBMC による 12 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生は TT 抗原依存性であった T 細胞依存性であると考えられた。

III. TT ワクチン初回接種前後の T 細胞による TT 抗原特異的ヘルパー活性

大塚らは抗原依存性に IgG 抗 TT 抗体を産生する

Table 2. IgG anti-TT antibody production in the supernatants of 4-day cultures of PBMC, T cells and non T cells¹⁾

Case	Cell fraction					
	PBMC ²⁾		T cells		Non T cells	
	(+) ³⁾	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
1 (4) ⁴⁾	70.5 ±21.1	72.9 ±50.6	0	0	14.2 ±3.5	19.5 ±4.0
2 (5)	26.3 ±4.0	42.5 ±9.7	0	0	28.1 ±8.2	39.8 ±12.5
3 (3)	12.3 ±1.3	16.8 ±2.9	0	0	11.3 ±3.4	21.3 ±4.2
4 (2)	147.1 ±24.4	184.8 ±48.8	0	0	181.6 ±8.5	174.3 ±27.3
5 (4)	282.5 ±53.1	349.1 ±38.1	0	0	333.1 ±27.2	426.3 ±22.4

- 1) The concentrations (ng/ml) of IgG anti-TT antibody are shown as mean \pm S.D. from 6 wells cultured.
- 2) PBMC = peripheral blood mononuclear cells
- 3) (+) means culture with TT antigen.
(-) means culture without TT antigen.
- 4) Number in parenthesis means the week when the study was done after the initial vaccination.

Table 3. Serial study of IgG anti-TT antibody production in the supernatants of 4-day cultures of non T cells with or without TT antigen¹⁾

Case	Presence of TT antigen in culture	Concentration (ng/ml) of IgG anti-TT antibody produced in 6 cultures of Non T cells tested												
		Weeks after the initial vaccination with TT antigen												
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15	18
1	+	32.6 ±6.0	164.7 ±22.4	14.2 ±3.5	4.1 ±1.3	0	0	0	0	0	0	nt ²⁾	nt	nt
	-	34.4 ±5.5	173.5 ±10.4	19.5 ±4.0	5.7 ±2.3	0.4 ±1.0	0	0	0	0	0	0	nt	nt
2	+	8.5 ±2.1	123.1 ±31.1	38.2 ±10.3	28.1 ±8.2	2.2 ±1.7	1.3 ±2.3	0	0.4 ±1.1	0	0	nt	nt	nt
	-	8.9 ±3.2	147.3 ±19.2	56.6 ±21.9	39.8 ±12.5	4.4 ±3.7	10.2 ±6.0	0	0.6 ±1.5	0	0	nt	nt	nt
3	+	0.5 ±1.2	11.3 ±3.4	64.2 ±8.8	0	0.3 ±0.7	0	0	0	0	0	nt	nt	nt
	-	3.7 ±4.4	21.3 ±4.2	115.0 ±11.9	1.2 ±1.4	0.9 ±1.6	0	0	0	0	0	nt	nt	nt
4	+	181.6 ±8.5	304.9 ±44.7	9.2 ±3.7	2.0 ±1.7	0	4.5 ±5.0	0	0	0	0	nt	nt	nt
	-	174.3 ±27.3	458.5 ±110.5	9.3 ±2.4	5.4 ±4.2	0	3.7 ±3.3	0	0	0	0	nt	nt	nt
5	+	0	39.3 ±6.2	333.1 ±27.2	0	5.7 ±5.0	0.8 ±1.3	0	0	0	0	0	nt	nt
	-	0	58.7 ±14.0	426.3 ±22.4	0	2.3 ±2.6	3.6 ±3.7	0	0	0	0	0	nt	nt

1) The concentrations (ng/ml) of IgG anti-TT antibody are shown as mean ± S.D. from 6 wells cultured.

2) nt=not tested

Table 4. Serial study of IgG anti-TT antibody production in the supernatants of 12-day cultures of PBMC with or without TT antigen¹⁾

Case	Presence of TT antigen in culture	Concentration (ng/ml) of IgG anti-TT antibody produced in 6 cultures of PBMC ²⁾ tested												
		Weeks after the initial vaccination with TT antigen												
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15	18
1	+	0.6 ±0.9	53.9 ±40.6	8.3 ±2.3	37.3 ±43.5	0	0	0	0.9 ±1.4	62.2** ⁴⁾ ±33.7	2.8 ±4.3	nt ³⁾	nt	nt
	-	0.4 ±0.9	40.2 ±10.7	7.6 ±1.7	22.5 ±8.9	nt	0	0	0	0	0	nt	nt	nt
2	+	0	22.8 ±3.7	8.3 ±2.7	44.3 ±23.6	1.8 ±3.1	3.2 ±4.2	3.3** ±4.2	3.0 ±4.2	27.8 ±22.3	6.8 ±8.2	nt	nt	nt
	-	0	28.5 ±19.1	6.2 ±2.3	13.6 ±3.5	nt	0	0	0	0	0	nt	nt	nt
3	+	0	0	7.4 ±1.6	1.0 ±2.4	0	0	0	0	1.8 ±3.4	3.5 ±5.2	nt	nt	nt
	-	0	0	14.4 ±9.7	0	0	0	0	0	0	0	nt	nt	nt
4	+	0	38.5 ±16.7	0	5.6 ±8.9	0	14.9 ±14.8	4.2** ±2.2	0	8.0** ±4.5	7.6 ±5.9	0.3 ±0.8	353.5 ±624.0	36.3 ±44.9
	-	9.4 ±3.9	19.6 ±4.7	2.1 ±2.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	+	0	0	15.6 ±11.6	0	0.4 ±0.9	1.1 ±1.8	0.4 ±0.9	0.3 ±0.8	1.0 ±1.7	0	25.3** ±14.8	nt	0
	-	0	2.3 ±0.5	12.6 ±3.6	0	0	0	0	0	0	0	0	nt	0

1) The concentrations (ng/ml) of IgG anti-TT antibody are shown as mean ± S.D. from 6 wells cultured.

2) PBMC= peripheral blood mononuclear cells

3) nt= not tested

4) Statistical significances are shown as follows; ** p<0.01 vs. culture without TT antigen by Welch's t-test

Table 5. IgG anti-TT antibody production in the supernatants of 12-day cultures of PBMC, T cells and non T cells¹⁾

Case	Cell fraction					
	PBMC ²⁾		T cells		Non T cells	
	(+) ³⁾	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
1 (10) ⁴⁾	62.2** ⁵⁾	0	0	0	0	0
	±33.7					
2 (10)	27.8*	0	0	0	0	0
	±22.3					
3 (11)	3.5	0	0	0	0	0
	±5.2					
4 (10)	8.0**	0	0	0	0	0
	±4.5					
5 (13)	25.3**	0	0	0	0	0
	±14.8					

- 1) The concentrations (ng/ml) of IgG anti-TT antibody are shown as mean ± S.D. from 6 wells cultured.
- 2) PBMC= peripheral blood mononuclear cells
- 3) (+) means culture with TT antigen.
(-) means culture without TT antigen.
- 4) Number in parenthesis means the week when the study was done after the initial vaccination.
- 5) Statistical significances are shown as follows:
* p<0.05 ** p<0.01 vs. PBMC culture without TT antigen by Welch's t-test

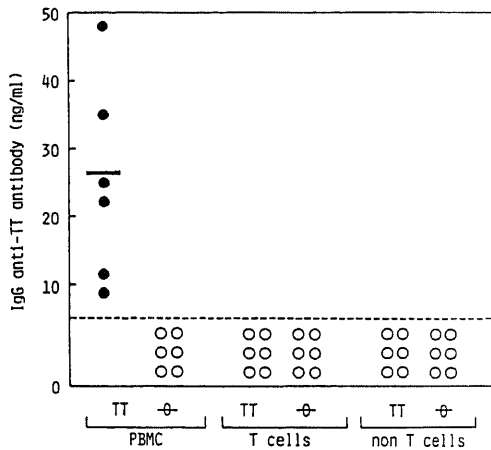


Fig. 2. Antigen and T cell dependency of IgG anti-TT antibody production in the 12-day supernatants. Various cultures studied are shown on the horizontal axis. PBMC, TT and ⊖ denote peripheral blood mononuclear cells, cultures with TT antigen and cultures without TT antigen, respectively. PBMC, T cells and non T cells contained 6×10^5 cells, 7×10^5 cells and 2×10^5 cells, respectively. Each circle represents the concentration of IgG anti-TT antibody (ng/ml) produced after 12-day of culture. Closed circles and open circles represent positive and negative wells, respectively. The geometric means are indicated by the — .

B細胞を TT 抗原特異的記憶B細胞と推定している¹⁹⁾²⁰⁾. TT 抗原特異的記憶B細胞による in vitro での抗体産生には, TT 抗原と自己T細胞の存在が必要であることが示されたが, 免疫前の PBMC からは IgG 抗 TT 抗体の産生は認められないことより, TT による初回免疫前後の T細胞で, TT 抗原特異的ヘルパー活性には差がある事が予想される. 図3はこの事を明らかにする目的で行った実験の代表的な結果である.

TT 抗原特異的記憶B細胞を豊富に含む追加免疫後の non T 細胞を単独で培養した場合にも, また初回免疫前の自己T細胞を加えて培養した場合にも IgG 抗 TT 抗体の産生は認められなかった. しかしこの non T 細胞に追加免疫後の自己T細胞または初回免疫後10週目の自己T細胞を加えると IgG 抗 TT 抗

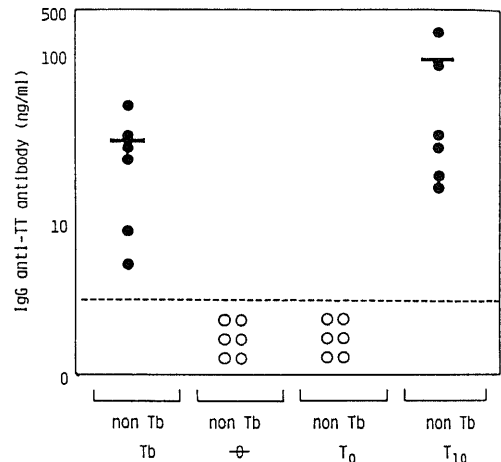


Fig. 3. Post-immunized T cell dependency of IgG anti-TT antibody production in the 12-day supernatants. Various cocultures studied are shown on the horizontal axis. NonTb, Tb, T₀, T₁₀ and ⊖ denote non T cells separated from PBMC after the booster immunization, T cells separated from PBMC after the booster immunization, T cells separated from PBMC before the primary immunization, T cells separated from PBMC 10 weeks after the primary immunization and cultures without T cells, respectively. Non T cells contained 2×10^5 cells and the (T+nonT) contained 7×10^5 T cells and 2×10^5 non T cells. Each culture contained 25ng/ml of TT antigen. Each circle represents the concentration of IgG anti-TT antibody (ng/ml) produced after 12-day of culture. Closed circles and open circles represent positive and negative wells, respectively. The geometric means are indicated by the — .

Table 6. Requirement of post-immunized T cells for IgG anti-TT antibody production in the supernatants of 12-day cultures¹⁾

Case	Control		Cocultures tested	
	non Tb	Tb+nonTb ²⁾	T0 ³⁾ +nonTb	T10 ⁴⁾ +nonTb
1	15.8 ±16.1	2737.9*** ⁵⁾ ±310.8	14.1 ±4.6	992.5## ±389.1
2	1.0 ±2.3	484.2** ±173.6	4.5 ±4.2	422.0 ±496.7
3	20.8 ±17.6	209.0* ±138.3	1.0 ±2.4	89.7## ±45.4
4	0	24.8 ±41.1	0	125.1 ±122.4
5	0	22.6* ±17.5	0	82.3 ±108.8

- 1) The concentrations (ng/ml) of IgG anti-TT antibody are shown as mean±S.D. from 6 wells cultured.
- 2) Tb, non Tb are separated from PBMC after the booster immunization.
- 3) T0 is separated from PBMC just before the initial immunization.
- 4) T10 is separated from PBMC 10 weeks after the initial immunization.
- 5) Statistical significances are shown as follows; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. non Tb and ##p < 0.01, vs. T0+non Tb by Welch's t-test

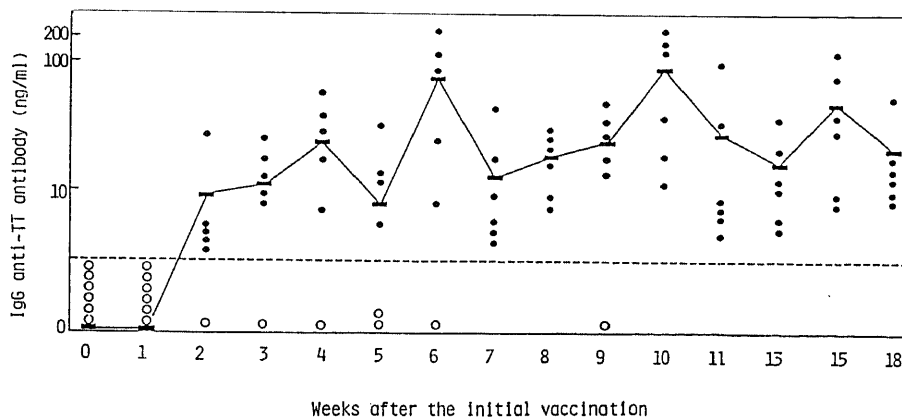


Fig. 4. Serial changes in antigen-specific helper T Cell activity after the primary immunization. Antigen-specific helper T cell activity was evaluated by IgG anti-TT antibody production cocultured with 2×10^5 fixed non T cells obtained 2 weeks after the booster immunization plus 7×10^5 T cells obtained serially after the primary immunization. Each circle represents the concentration of IgG anti-TT antibody (ng/ml) produced after 12-day of culture. Closed circles and open circles represent positive and negative wells, respectively. The geometric means are indicated by the **—**.

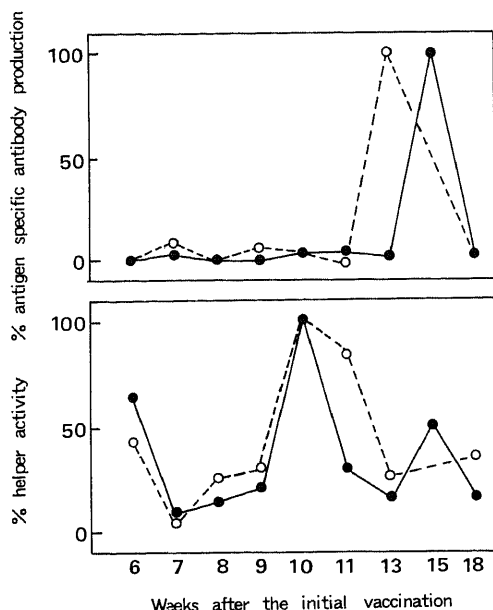


Fig. 5. Difference of the kinetics between antigen-specific helper T cell activity (%) and antigen-specific antibody production by PBMC (%) after the primary immunization. The % antigen-specific helper T cell activity was defined as (antigen-specific helper activity of each week)/(Maximum antigen-specific helper activity) $\times 100$ and % antigen-specific antibody production was defined as (antigen-specific antibody production of each week)/(Maximum antigen-specific antibody production) $\times 100$. (●) and (○) denote Case 4 and Case 5, respectively.

体の産生は認められた。

表 6 に全例の実測値を示す。Case 1~3 で追加免疫後の non T 細胞分画中に TT 抗原非依存性かつ T 細胞非依存性に IgG 抗 TT 抗体を産生する B 細胞が含まれている点を除けば全例で同様の結果が得られた。

以上より non T 細胞による抗原依存性の IgG 抗 TT 抗体産生は初回免疫後の T 細胞依存性であると考えられた。

IV. TT ワクチン初回接種後の TT 抗原特異的ヘルパー T 細胞活性の経時的変化

TT 抗原特異的ヘルパー T 細胞活性は、TT ワクチンでの初回免疫前の T 細胞には認められず初回免疫後の T 細胞には認められることが明らかになったため、次に TT 抗原特異的ヘルパー T 細胞活性の経時的な変化を検討した。図 4 に、追加免疫後の non T 細胞に初回免疫前後経時的に採取した自己 T 細胞と TT 抗原を添加培養して得た IgG 抗 TT 抗体産生の変化を示す。初回免疫後 1 週目の自己 T 細胞を加えた培養の 12 日目上清中には IgG 抗 TT 抗体は検出されなかったが、2 週目以降の自己 T 細胞を加えた培養では検出された。その後 18 週目まで検索を続けたが、IgG 抗 TT 抗体は、その産生量は経時的に変動を示したものの常に検出された。表 7 に検討した全例の実測値を示したが、各例により若干差は認められるものの、ほぼ同様の傾向がみられた。即ち Case 1~3 では初回免疫前の自己 T 細胞を加えた培養系の IgG 抗 TT 抗体の産生量に比べて、初回免疫後 2 又は 3 週目以降の自己 T 細胞を加えた培養系で IgG 抗 TT 抗体の産生が増加する傾向が認められ、Case 4, 5 では初回免疫後 1 又は 2 週目以降の自己 T 細胞を加えた培養系で IgG 抗 TT 抗体の産生が認められた。この IgG 抗 TT 抗体の産生 11~18 週目まで

Table 7 Serial changes in antigen-specific helper T cell activity after the initial vaccination¹⁾

Case	Weeks after the initial vaccination with TT antigen																	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15	18			
1	14.1 ±4.6	14.5 ±11.3	67.3 ±48.8	196.9 ±288.7	4098.7* ²⁾ ±1292.3	1350.1 ±808.4	295.0 ±562.2	22.0 ±20.2	44.2 ±58.7	651.3 ±306.4	992.5 ±389.1	3957.2* ±3028.1	nt ²⁾	nt	nt			
2	4.5 ±4.2	7.8 ±12.9	33.8 ±30.5	27.0 ±8.3	395.1 ±229.6	143.0 ±66.0	10.7 ±10.3	201.0 ±100.5	62.7 ±38.0	129.0 ±104.6	422.0* ±496.7	554.0* ±378.8	nt	nt	nt			
3	1.0 ±2.4	2.8 ±4.3	4.8 ±4.3	27.5 ±6.0	40.8 ±17.5	73.5 ±58.4	11.6 ±7.8	49.4 ±10.0	148.9* ±114.0	37.2 ±10.4	89.7 ±45.4	120.4* ±68.7	nt	nt	nt			
4	0	0	9.6 ±17.6	12.6 ±8.5	26.3 ±20.8	8.9 ±9.8	82.7 ±85.9	13.1 ±14.6	18.0 ±8.5	25.0 ±17.7	125.1* ±122.4	36.9 ±58.3	18.9 ±18.8	62.4 ±66.4	23.3 ±24.2			
5	0	2.6 ±0.5	nt	52.9 ±43.6	31.6 ±29.2	19.3 ±14.4	26.3 ±27.5	5.8 ±2.3	19.2 ±13.0	24.3 ±30.6	82.3 ±108.8	68.8 ±65.0	22.2 ±23.4	nt	29.4 ±20.8			

- 1) Antigen-specific helper T cell activity is evaluated by IgG anti-TT antibody production cocultured fixed non T cells plus T cells obtained serially after the initial vaccination, where the concentrations (ng/ml) of IgG anti-TT antibody are shown as mean \pm S.D.
- 2) nt = not tested
- 3) Statistical significances are shown as follows; * $p < 0.05$ vs. culture at 0 week by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison procedure

検索を行ったところ、症例により差があり、また初回免疫後の時期により変動がみられるものの常に検出された。

6週以降のPBMCによる12日目上清中のIgG抗TT抗体産生とTT抗原特異的ヘルパーT細胞活性を比較したところ、図5に示すように、TT抗原特異的ヘルパーT細胞活性は認められるにもかかわらず、PBMCによる12日目上清中のIgG抗TT抗原産生の認められない時期が存在した。

考 察

本研究における成績から、健康成人をTTで初回免疫した場合、PBMCによる培養4日目上清中のTT抗原非依存性に認められるIgG抗TT抗体産生は、T細胞非依存性であり、一方、培養12日目上清中のTT抗原依存性に認められるIgG抗TT抗体産生はT細胞依存性であることが明らかとなった。さらに、このTT抗原特異的抗体産生に必要なT細胞は、in vivoのTTでの免疫後のものであることが必要であり、そのヘルパー活性を経時的に検討すると、初回免疫後の時期により変動することが明らかとなった。

PBMCによる4日目上清中のIgG抗TT抗体産生は大塚らの報告¹⁹⁾²⁰⁾と同様に初回免疫後2週目から認められ6~10週目まで持続した(表1)。この4日目上清中のIgG抗TT抗体産生は、TT抗原無添加でnon T細胞分画のみでも認められ(表3)、かつ、その出現時期がPBMCによる4日目上清中のIgG抗TT抗体産生の出現時期と一致していたので、T細胞非依存性でかつTT抗原非依存性に自然にIgG抗TT抗体を産生する抗原特異的B細胞によるものと考えられる。追加免疫後には、我々の検出したB細胞と同様にT細胞非依存性でかつマイトジェン非依存性にIgG抗TT抗体を産生するB細胞が末梢血を循環することが報告されている。しかしその出現時期は初回免疫の場合とは異なっている。Stevensら²⁹⁾、Geha³⁰⁾はTTの追加免疫において、追加免疫後5日以内にT細胞やPWMの非依存下でIgG抗TT抗体を自然に産生するB細胞が末梢血液中に検出できるようになり、1週間後には消失したと報告している。又、Kishimotoら³¹⁾は、TTワクチンによる初回免疫後6週目に追加免疫した際に、その後短期間自然にIgG抗TT抗体を産生する末梢血B細胞が認められたと報告している。このように追加免疫後に認められる、自然にIgG抗TT抗体産生を行うB細胞の出現期間が初回免疫の場合よりも短

い理由は不明であるが、追加免疫での抗原特異的抗体産生系では抗原特異的サブレッサーT細胞の出現²⁹⁾、抗イディオタイプ抗体によるサブレッサーT細胞の誘導³²⁾が報告されており、T細胞を介して抗体産生が抑制される可能性が考えられる。又、測定法や培養条件の差も考えられる。つまり今回の実験の細胞濃度は 3×10^6 /mlとこれまでの2~3倍の濃度であり、加えて培養ウェル数は6ウェルとこれまでの2~3倍の条件で実施したので抗原特異的抗体産生を検出する感度が高いと考えられる。いずれにせよ、TT初回免疫時にも追加免疫の場合と同様にin vivoでTT抗原刺激により活性化され抗体産生細胞へ分化し、自然にIgG抗TT抗体を産生するB細胞が末梢血液中を循環する時期が存在するものと考えられた。

興味深いことに、Case 1, 2, 4, 5ではこれまでの報告¹⁹⁾²⁰⁾と異なり、PBMCによる4日目上清中のIgG抗TT抗体産生が上清中に検出されるようになった後に一時期陰性化し、その後再び陽性化している(表1)。non T細胞による4日目上清中のIgG抗TT抗体産生も全く同様の変動を示している(表3)ことから、T細胞を介した変動とは考えにくい。最近大塚ら³³⁾は、初回免疫後の骨髄リンパ球を経時的に採取し、そのIgG抗TT抗体産生を検討した結果、自然にIgG抗TT抗体を産生するB細胞が末梢血に出現する時期より1週間おくれて骨髄中に出現し、末梢血から消失した後も長期間骨髄中に存在することを見出し報告している。又、IgM抗TT抗体を検討した同様の報告³⁴⁾もあることから、抗原刺激で活性化されたBリンパ球が末梢血中を循環した後に2次性リンパ系臓器へsequestrationされるためIgG抗TT抗体を産生するB細胞の末梢血液中への出現頻度が変動した可能性も考えられる。

PBMCによる12日目上清中のIgG抗TT抗体産生は初回免疫6週目以降、抗原依存性であった(表4)。又、T細胞、non T細胞のみではIgG抗TT抗体産生は認められないが(表5)、T細胞とnon T細胞を混合培養することにより認められたことより(データ省略)、12日目上清中のIgG抗TT抗体産生はさらにT細胞依存性であり、T細胞のヘルパー機能が必要であると考えられた。静止期のB細胞が活性化され抗体産生細胞へ分化するにはT細胞の役割が重要である³⁵⁾ことより、6週目以降の12日目上清中のIgG抗TT抗体の産生は静止期にあるTT抗原特異的記憶B細胞がT細胞のヘルパー機能のもとでin vitroでのTT抗原刺激により活性化

され、抗体産生細胞へ分化したものと考えられる。このような TT 抗原特異的記憶B細胞は、PWM を用いた系で追加免疫後に出現することが報告されているが、その出現時期は初回免疫の場合と差がみられている。Stevens ら²⁰および Saxon ら²⁰は、TT 追加免疫後にはまず自然に IgG 抗 TT 抗体を産生する B 細胞が末梢血液中に出現し、次にそれが消失した後 PWM と T 細胞に反応して IgG 抗 TT 抗体を産生する TT 抗原特異的記憶B細胞が出現し、60日目には消失したと報告している。一方、大塚²⁰は、TT 抗原依存性に IgG 抗 TT 抗体を産生する TT 抗原特異的記憶B細胞が、初回免疫後2週目から出現し13週目まで認められたと報告している。著者の結果でも、TT 抗原特異的記憶B細胞は11~18週目まで比較的長期間認められた。この TT 抗原特異的記憶B細胞の出現時期に差が認められる原因としては初回免疫と追加免疫の差ばかりでなく、in vitro における PWM と TT の抗原刺激の差による事も考えられる。

興味深いことに、Case 4, 5 では6週目以降に IgG 抗 TT 抗体産生がいったん陽性化してから陰性化し、再び陽性化している。このような12日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生の経時的な変動の認められるメカニズムとしては、これまでの報告から T 細胞側の要因と B 細胞側の要因とが考えられる。つまり、1) 追加免疫の場合、免疫後2週目から4ヶ月目まで血清中に検出され、in vitro において IgG 抗 TT 抗体産生を抑制したと報告されている抗イデオタイプ抗体による抑制^{20,21}、2) 追加免疫の場合免疫後20~60日頃に出現する抗原特異的サブレッサー T 細胞の影響²¹、3) TT 抗原特異的記憶B細胞機能の低下による影響²¹、4) TT 抗原特異的記憶B細胞の末梢血液中への出現頻度の減少などである。

In vitro での抗原刺激による抗原特異的抗体産生の T 細胞依存性は、これまでもインフルエンザウイルス²⁰、keyhole limpet hemocyanin (KLH)²⁰ および TT²⁰ を用いた系で報告されている。抗原特異的 B 細胞の活性化過程には、その B 細胞と抗原特異性および主要組織適合抗原の一致したヘルパー T 細胞が必要である²⁰ことから、これらの系でヘルパー機能を発揮している T 細胞は、少なくとも B 細胞の活性化過程では、B 細胞と同様の抗原特異性を持った抗原特異的ヘルパー T 細胞であると考えられる。しかしこれらの系はすべて抗原で感作された後の T 細胞の活性を検討しており、感作前の T 細胞の抗原特異的ヘルパー活性を検討した報告は少なく⁴⁰、著者の研究で、TT 初回免疫前の T 細胞が TT 抗原刺激によ

りヘルパー活性を発揮できなかった点(表6)は注目される。初回免疫前にすでに生体には T 細胞集団の中にそれぞれの抗原と特異的に反応し、活性化されるクローンが存在すると考えられており⁴¹、従って TT 初回免疫前の T 細胞の中にも TT 抗原特異的ヘルパー T 細胞が存在すると考えられる。初回免疫前の TT 抗原特異的ヘルパー T 細胞がそのヘルパー活性を発揮できなかった点については、今後、初回免疫前後の抗原特異的ヘルパー T 細胞の質的あるいは量的な差を検討していく必要があると思われる。

抗原刺激により誘導される TT 抗原特異的ヘルパー T 細胞活性は、初回免疫後1~3週目より出現した。Stevens ら²¹は、TT での追加免疫2週後の末梢血液中 T 細胞には in vitro での PWM 刺激により誘導される TT 抗原特異的ヘルパー活性が増強していることを示している。しかし、PWM は非特異的な抗原刺激として作用することから、TT 抗原刺激により誘導されるヘルパー T 細胞活性と PWM 刺激により誘導されるヘルパー T 細胞活性とはそれぞれ異なったものをみている可能性も否定できない。

TT 抗原特異的ヘルパー T 細胞活性は、初回免疫後の時期により変動を示した(表7)。Zöller ら⁴²はマウスの系で、トリニトロフェニル (Trinitrophenyl, TNP) に対するブランク形成細胞数を指標として、初回免疫後の TNP 特異的ヘルパー T 細胞および、TNP 特異的サブレッサー T 細胞の脾内への出現頻度を検討した結果、初回免疫後の時期により、TNP 特異的ヘルパー T 細胞の出現頻度が変動し、しかも TNP 特異的サブレッサー T 細胞の出現頻度がそれとは逆の変動を示すことを観察している。従って TT 抗原特異的ヘルパー T 細胞活性が変動した原因としては、1) TT 抗原特異的あるいは、非特異的サブレッサー T 細胞の影響、2) TT 抗原特異的あるいは、非特異的ヘルパー T 細胞の末梢血液中への出現頻度の減少あるいは機能の低下などが考えられる。

TT 抗原特異的ヘルパー T 細胞活性が認められるにもかかわらず、PBMC による12日目上清中 IgG 抗 TT 抗体産生の認められない時期が存在したこと(図5)より、初回免疫後の TT 抗原特異的記憶B細胞による in vitro での IgG 抗 TT 抗体産生の経時的な変動の原因は、TT 抗原特異的ヘルパー T 細胞活性の変動の影響のみでは説明できないと思われる。Shiobara ら¹⁸、Callard ら⁴³は、ヘルパー T 細胞活性が存在するにもかかわらず、抗原特異的抗体産生が認められない症例があり、原因は non T 細胞群の特に B 細胞にあると報告している。従って本研究

における PBMC による IgG 抗 TT 抗体産生の経時的変動の原因も主に B 細胞側にあり、1) B 細胞の末梢血液中の出現頻度の変動や、2) B 細胞機能の低下の影響などが考えられる。

本研究の成績は、末梢血液中の T 細胞および non T 細胞を用いたものであるが、生体内で抗原特異的な免疫反応を生じている部位は末梢血液中以外である可能性も考えられる。Geha³⁰⁾は TT での追加免疫後 1~2 日後に *in vitro* での TT 抗原刺激に反応し増殖する T 細胞および TT 抗原と結合する B 細胞が末梢血液中から減少することを観察している。又、最近、末梢血液中のリンパ球と、リンパ節・脾臓・骨髄などのリンパ系臓器内のリンパ球との免疫学的性質の違い^{34)43)~45)}が明らかにされてきている。今後末梢血リンパ球だけでなく、このようなリンパ系臓器内のリンパ球による抗原特異的抗体産生機序の検討によって、不明な点の多い免疫学的記憶のメカニズム⁴⁶⁾⁴⁷⁾も含めて、初回免疫後の生体内における免疫学的出来事が明らかになっていくものと考えられる。

結 論

健康成人を対象として、TT による初回免疫後の PBMC による *in vitro* での抗原特異的抗体産生の T 細胞依存性、および初回免疫前後の末梢血液中の抗原特異的ヘルパー T 細胞活性について経時的に検討し以下のような成績を得た。

1. *in vitro* で自然に IgG 抗 TT 抗体を産生する B 細胞による抗体産生は T 細胞非依存性である。
2. *in vitro* での TT 抗原刺激により IgG 抗 TT 抗体を産生する TT 抗原特異的記憶 B 細胞による抗体産生は TT での初回免疫後の T 細胞依存性である。
3. TT での初回免疫前の T 細胞は、TT 抗原特異的ヘルパー活性を発揮できない。
4. TT 抗原特異的ヘルパー活性は、初回免疫後 1~3 週目に出現し、個体差があるものの初回免疫後の時期により活性の強さが変動した。しかし検討した 11 週~18 週目まで検出され続けた。
5. TT 抗原特異的記憶 B 細胞による IgG 抗 TT 抗体産生の経時的な変動と TT 抗原特異的ヘルパー T 細胞活性の経時的な変動は、必ずしも一致しなかった。

以上の成績から、末梢血液中の T 細胞による TT 抗原特異的ヘルパー活性は、TT での初回免疫後始めて出現し、その後 TT 抗原特異的記憶 B 細胞による抗体産生活性とは異なった経時的変動を示すこ

とが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師松田保教授に深甚の謝意を表します。また直接御指導、御援助を頂いた金沢大学第三内科塩原信太郎博士および原田実根講師（現九州大学第一内科）、ならびに多大な御協力を頂いた金沢大学第三内科免疫研究グループの諸先生および教室員諸氏そして精製した IgG 抗 TT 抗体を御供与戴いた Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle, WA, U.S.A.) の Dr. Lawrence G. Lum に深く感謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は、第 29 回日本臨床血液学会 (1987) および第 17 回日本免疫学会 (1987) において発表された。

文 献

- 1) Stevens, R. H. & Saxon, A.: Differential synthesis of IgM and IgG anti-tetanus toxoid antibody *in vitro* following *in vivo* booster immunization of humans. *Cell. Immunol.*, **45**, 142-150 (1979).
- 2) Thiele, C. J. & Stevens, R. H.: Antibody potential of human peripheral blood lymphocytes differentially expressing surface membrane IgM. *J. Immunol.*, **124**, 1898-1904 (1980).
- 3) Thiele, C. J., Morrow, C. D. & Stevens, R. H.: Multiple subsets of anti-tetanus toxoid antibody-producing cells in human peripheral blood differ by size, expression of membrane receptors, and mitogen reactivity. *J. Immunol.*, **126**, 1146-1153 (1981).
- 4) Kishimoto, S., Tomino, S., Mitsuya, H. & Nishimura, H.: Age-related decrease in frequencies of B-cell precursors and specific helper T cells involved in the IgG anti-tetanus toxoid antibody production in humans. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **25**, 1-10 (1982).
- 5) Stevens, R. H., Benveniste, E. & Pineda, E.: The selective role of membrane IgG in the antigen-induced inhibition of human *in vitro* antibody synthesis. *J. Immunol.*, **128**, 398-401 (1982).
- 6) 満屋裕明, 富野新八郎, 藤原弘一, 河野文夫, 岸本 進, 山本次郎: 免疫不全症における特異抗体産生の *in vivo* および *in vitro* 解析. *臨床免疫*, **14** (Suppl. 5), 35-44 (1982).
- 7) Stevens, R., Dichek, D., Keld, B. & Heiner D.: IgG₁ is the predominant subclass of in

- vivo-and vitro-produced anti-tetanus toxoid antibodies and also serves as the membrane IgG molecule for delivering inhibitory signals to anti-tetanus toxoid antibody-producing B cells. *J. Clin. Immunol.*, **3**, 65-69 (1983).
- 8) 岸本 進: シンポジウム, 老化と生体反応 4. 老化と生体反応-免疫学の立場から. 日内会誌, **74**, 15-18 (1985).
- 9) Callard, R. E.: Specific in vitro antibody response to influenza virus by human blood lymphocytes. *Nature*, **282**, 734-736 (1979).
- 10) Souhami, R. L., Babbage, J. & Callard, R. E.: Specific in vitro antibody response to varicella zoster. *Clin. exp. Immunol.*, **46**, 98-105 (1981).
- 11) Volkman, D. J., Lane, H. C. & Fauci, A. S.: Antigen-induced in vitro antibody production in humans: A model for B cell activation and immunoregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 2528-2531 (1981).
- 12) Lane, H. C., Volkman, D. J., Whalen, G. & Fauci, A. S.: In vitro antigen-induced, antigen-specific antibody production in man. Specific and polyclonal components, kinetics, and cellular requirements. *J. Exp. Med.*, **150**, 1043-1057 (1981).
- 13) Volkman, D. J., Allyn, S. P. & Fauci, A. S.: Antigen-induced in vitro antibody production in humans: Tetanus toxoid specific antibody synthesis. *J. Immunol.*, **129**, 107-112 (1982).
- 14) Moore, A. L., Ershler, W. B. & Hacker, M. P.: Specific antibody synthesis in vitro I. Technical considerations. *J. Immunol. Methods*, **70**, 13-21 (1984).
- 15) Lum, L. G. & Culbertson, N. J.: The induction and suppression of in vitro IgG anti-tetanus toxoid antibody synthesis by human lymphocytes stimulated with tetanus toxoid in the absence of in vivo booster immunizations. *J. Immunol.* **135**, 185-191 (1985).
- 16) Lum, L. G. & Culbertson, N. J.: Induction of in vitro IgG anti-tetanus toxoid antibody synthesis in man without in vivo booster immunization. *Clin. Res.*, **32**, 352A (1984).
- 17) Lum, L. G., Shiobara, S., Culbertson, N. J. & Storb, R.: T and B cell collaboration for tetanus toxoid induction of in vitro IgG anti-tetanus toxoid synthesis after human bone marrow grafting. *Exp. Hematol.*, **12**, 12 (1984).
- 18) Shiobara, S., Lum, L. G., Witherspoon, R. P. & Storb, R.: Antigen specific antibody response of lymphocytes to tetanus toxoid after human marrow transplantation. *Transplantation*, **41**, 587-592 (1986).
- 19) 大塚 実, 塩原信太郎, 原田実根, 上田幹夫, 尾高和亮, 近藤邦夫, 中尾真二, 森 孝夫, 松田保: 破傷風トキソイド初回免疫後の in vitro 抗原特異的抗体産生. *臨床免疫*, **18**, 929-932 (1986).
- 20) 大塚 実: 破傷風トキソイド初回免疫後の in vivo および in vitro 抗原特異的抗体産生. *十全医会誌*, **96**, 142-152 (1987).
- 21) Stevens, R. H. & Saxon, A.: Immunoregulation in humans. Control of anti-tetanus toxoid antibody production after booster immunization. *J. Clin. Invest.*, **62**, 1154-1160 (1978).
- 22) Macy, E. & Stevens, R. H.: A restricted component of T cell help in pokeweed mitogen-stimulated human peripheral blood cell cultures. *J. Immunol.*, **124**, 752-759 (1980).
- 23) Smith, C. M. & Callard, R. E.: Antigen specificity and frequency of autologous and allogeneic helper T cells in the in vitro production of antibody against influenza virus by human blood lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **12**, 558-563 (1982).
- 24) Boyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **21**, 77 (1968).
- 25) Pellegrino, M. A., Ferrone, S., Dierich, M. P. & Reisfeld, R. A.: Enhancement of sheep red blood cell human lymphocyte rosette formation by the sulfhydryl compound 2-aminoethylisothiouonium bromide. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **3**, 324-333 (1975).
- 26) Saxon, A., Feldhaus, J. L., & Robbins, R. A.: Single step separation of human and B cells using AET treated SRBC rosettes. *J. Immunol. Methods*, **12**, 285 (1976).
- 27) 吉永 秀: 免疫実験操作法, **692**, A 450 (1973).
- 28) Duncan, R. C., Knapp, R. G. & Miller III, M. C.: Introductory biostatistics for the health sciences. 2nd ed., p137-159, A Wiley medical

publication New York, 1983.

29) Stevens, R. H., Macy, E., Morrow, C. & Saxon, A.: Characterization of a circulating subpopulation of spontaneous antitetanus toxoid antibody producing B cells following in vivo booster immunization. *J. Immunol.*, **122**, 2498-2504 (1979).

30) Geha, R. S.: Dynamics of human circulating antigen reactive cells following secondary immunization with tetanus toxoid. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **19**, 196-205 (1981).

31) Kishimoto, S., Tomino, S., Mitsuya, H., Fujiwara, H. & Tsuda, H.: Age-related decline in the in vitro and in vivo synthesis of anti-tetanus toxoid antibody in humans. *J. Immunol.*, **125**, 2347-2352 (1980).

32) Saxon, A. & Barnett, E.: Human auto-anti-idiotypes regulating T cell-mediated reactivity to tetanus toxoid. *J. Clin. Invest.*, **73**, 342-348 (1984).

33) 大塚 実, 塩原信太郎, 原田実根, 上田幹夫, 岩淵邦芳, 松田 保, 金沢大学骨髓移植チーム: 破傷風トキシソイドワクチン初回免疫後の人末梢血単核球および骨髓単核球における抗原特異的抗体産生能. 日本免疫学会総会・学術集会記録, **16**, 229 (1986).

34) Kodo, H., Gale, R. P. & Saxon, A.: Antibody synthesis by bone marrow cells in vitro following primary and booster tetanus toxoid immunization in humans. *J. Clin. Invest.*, **73**, 1377-1384 (1984).

35) Singer, A. & Hodes, R. J.: Mechanisms of T cell-B cell interaction. *Ann. Rev. Immunol.*, **1**, 211-241 (1983).

36) Saxon, A., Tamaroff, M. A., Morrow, C. & Stevens, R. H.: Impaired generation of spontaneous and mitogen-reactive anti-tetanus toxoid antibody-producing B cells following repetitive in vivo booster immunization. *Cell. Immunol.*, **59**, 82-96 (1981).

37) Geha, R. S.: Presence of circulating anti-idiotypic bearing cells after booster immunization with tetanus toxoid (TT) and inhibition of anti-TT antibody synthesis by auto-anti-idiotypic antibody. *J. Immunol.*, **130**, 1634-1639 (1983).

38) Callard, R. E. & Smith, C. M.: Histocom-

patibility requirements for T cell help in specific in vitro antibody responses to influenza virus by human blood lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **11**, 206-212 (1981).

39) Morimoto, C., Reinherz, E. L. & Schlossman, S. F.: Primary in vitro anti-KLH antibody formation by peripheral blood lymphocytes in man: detection with a radioimmunoassay. *J. Immunol.*, **127**, 514-517 (1981).

40) Yachie, A., Tosato, G., Straus, S. E. & Blaese, R. M.: Immunostimulation by cytomegalovirus (CMV): helper T cell-dependent activation of immunoglobulin production in vitro by lymphocytes from CMV-immune donors. *J. Immunol.*, **135**, 1398-1400 (1985).

41) 鈴木 元: T細胞レセプターと抗原認識. *Annual Review 免疫 1987* (菊地浩吉, 矢田純一, 奥村 康編), 1-10 頁, 中外医学社, 東京, 1987.

42) Zöller, M., Lopatta, D., Benato, B. & Andrighetto, G.: Oscillation of antibody production and regulatory T cells in response to antigenic stimulation. *Eur. J. Immunol.*, **15**, 1198-1203 (1985).

43) Callard, R. E., McCaughan, G. W., Babbage, J. & Souhami, R. L.: Specific in vitro antibody responses by human blood lymphocytes: Apparent nonresponsiveness of PBL is due to a lack of recirculating memory B cells. *J. Immunol.*, **129**, 153-156 (1982).

44) Clark, P., Normansell, D. E., Innes, D. J. & Hess, C. E.: Lymphocyte subsets in normal bone marrow. *Blood*, **67**, 1600-1606 (1986).

45) Anderson, D. C., Roach, J. A., Daley, J. F., Schlossman, S. F. & Nadler, L. M.: Dual fluorochrome analysis of human B lymphocytes: Phenotypic examination of resting, anti-immunoglobulin stimulated and in vivo activated B cells. *J. Immunol.*, **136**, 3612-3618 (1986).

46) 黒沢良知: Bリンパ球レパトリー形成の遺伝子機構. *免疫薬理*, **3**, 374-378 (1985).

47) Tizard, I. R.: The response of B cells to antigen. In I. R. Tizard (ed.), *Immunology: An Introduction*, 1st ed. p180-220, Saunders College Publishing, New York, 1984.

Antigen-Specific Helper T cell Activity in Man after Primary Immunization with Tetanus Toxoid Kuniyoshi Iwabuchi, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 97, 854—868 (1988)

Key words : primary immunization, tetanus toxoid, IgG anti-tetanus toxoid antibody, antigen-specific helper T cell activity

Abstract

In an attempt to gain an insight into the kinetics and mechanisms of in vivo antigen specific immune response, we studied tetanus toxoid (TT) antigen-specific antibody responses in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), T cells and non T cells obtained from 5 normal volunteers immunized in vivo with TT antigen. These volunteers who have no history of tetanus infection were inoculated with TT vaccine 3 times at a weekly interval as primary immunization. PBMC, T cells and non T cells were separated from heparinized peripheral blood obtained before and weekly after the primary immunization until 11 weeks and thereafter biweekly until 18 weeks. In vitro IgG anti-TT antibody titers in the 4-day supernatants and the 12-day supernatants produced by PBMC, T cells, non T cells and a combination of T and non T cells with or without TT antigen were measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Before immunization, PBMC, T cells, non T cells and a combination of T and non T cells in all cases failed to produce IgG anti-TT antibody. Two weeks after the immunization, IgG anti TT antibody was detected in the 4-day supernatants from both PBMC and non T cells regardless of the presence or absence of TT antigen in cultures. IgG anti-TT antibody was also detected in the 12-day supernatants 2 weeks after the immunization. After 6 weeks, IgG anti-TT antibody production by PBMC and a combination of T and non T cells was detected only when TT antigen was present in cultures. In any case, TT-specific helper T cell activity was not detected in cultures obtained before TT immunization. T cells gained TT-specific helper activity 1 to 3 weeks after the primary immunization and retained the activity up to 18 weeks. Interestingly, the kinetics of the T cell helper activity generated after the primary immunization was different from that of in vitro IgG anti-TT antibody production by PBMC. These results indicate that spontaneous IgG anti-TT antibody production in the 4-day supernatants is T cell independent, whereas antigen dependent IgG anti-TT antibody production detected in the 12-day supernatants is T cell dependent. Furthermore, T cells seem to acquire TT-specific helper activity after the primary immunization and the ability of help to antigen-specific antibody production in vitro changes with the amount of time after the primary immunization.