

Antigen-Specific Antibody Responses 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/2297/7925

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

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

大 塚 実

(昭和62年1月13日受付)

In vivo および *in vitro* における抗原特異的抗体産生の経時的变化を知る目的で、破傷風の既往および破傷風トキソイド (tetanus toxoid, TT) ワクチン接種歴のない健康成人6例に対してTTワクチンを接種し、経時的に血清抗体価と末梢血単核球のTT抗原特異的抗体産生を測定した。末梢血単核球は、TT抗原無添加あるいは添加した系で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すらに8日間培養を継続した後上清を採取した(12日目上清)。血清および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剤検定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) を用いて測定したところ以下の結果を得た。免疫前には全例、血清中および4日目上清、12日目上清中のIgG抗TT抗体は検出されなかった。血清抗体価は初回接種後1~5週目に陽性化し、15~36週目に陰性化した。6例中5例で、血清抗体価が陽性を示す時期に末梢血単核球による*in vitro*における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抗原の有無にかかわらずに検出されたが、12日目上清中のIgG抗TT抗体産生は培養液中にTT抗原が存在する場合のみに検出された。これらの所見は*in vitro*におけるIgG抗TT抗体産生には、免疫後2週目に出現し、6週目には消失した抗原非依存性の抗体産生と、免疫後2~11週目から現れ、9~20週目には消失した抗原依存性の抗体産生の2種類の型が存在することを示唆した。これらの所見より、自然にIgG抗TT抗体を産生するB細胞が、少くとも血清抗体価が陽性を示す時期に末梢血液中を循環しており、一方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細胞と同時に、またはその消失よりやや遅れて末梢血液中を循環していると考えられた。

Key words primary immunization, tetanus toxoid, IgG anti-tetanus toxoid antibody, spontaneous antigen-specific antibody producing B cell, antigen-specific memory B cell

In vitro における抗体産生に関する研究には、これまで主としてポーク・ウィードマイトジェン (pokeweed mitogen, PWM) による非特異的な抗原刺激によって多クローン性抗体産生を誘導する系を用いて解析が行われてきた。ヒト末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) の破傷風トキソイド (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)~8)}。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ので、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 抗体産生を反映することになるので、抗原特異的抗体産生の評価は困難であった。このため、抗原初回免疫後の *in vivo* における抗原特異的抗体産生や末梢血液中の抗原特異的抗体産生細胞の動態については、未だ不明な点が多い。

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

Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IgG, immunoglobulin G; OD, optical density; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PBS, phosphate buffered saline; PWM, pokeweed mitogen; TT, tetanus toxoid.

てきた^{9)~14)}。しかしながら、従来の報告^{12)~14)}では、TTを抗原とする *in vitro* 抗原特異的抗体産生はすべて2次免疫に関するものであり、また *in vitro* での検討には対象の追加免疫が必須であるため応用が限定されていた。最近 Lum ら^{15)~17)}、Shiobara ら¹⁸⁾ は、*in vitro* 抗体産生のための培養法に改良を加え、さらに培養開始後4日目に上清中からいったん抗原を除去することによって、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ていることを明らかにしている。

破傷風に対する免疫は不顕性感染によって得られることはなく、破傷風罹患後でも免疫は不十分であり、破傷風に対する免疫を与える方法は予防接種以外にはない¹⁹⁾²⁰⁾とされている。そこで、著者はTTによる初回免疫後の *in vivo* および *in vitro* における抗原特異的抗体産生について、TT ワクチンを接種した健康成人を対象に検討した。

対象および方法

I. 対象

破傷風の既往およびTT ワクチン接種歴のない健康成人34名(男性32名、女性2名、年齢:17~48歳、平均30.4歳)を対象として選び、全例から血清を、20名(男性18名、女性2名、年齢:22~40歳、平均28.5歳)よりPBMCを採取した。対象のうち同意の得られた6名(男性、26~40歳)をTT初回接種の対象とした。

II. 免疫方法

TT ワクチン初回接種の対象とした6名(case 1-6)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)0.5 mlを筋肉内に接種し、これを0週目とした。その後1週目に追加接種し、さらにcase 5を除く5例に対しては3週目にも追加接種を行い、case 6に対しては13週目にも追加接種を行った。

III. 血清およびPBMCの採取

採血は、初回接種後9週目までは毎週1回、その後は2~3週間隔で26~36週目まで行った。採取した血清は測定時まで-20°Cで凍結保存した。PBMCはヘパリン加末梢血をFicoll-Hypaque比重遠心法を用いて分離し、RPMI 1640培養液(GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.)で抗TT抗体を除去するために6回洗浄し、以下の実験に用いた。

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

TT抗原刺激によるIgG抗TT抗体の*in vitro*での産生はLumら¹⁵⁾の方法を用いて検討した。まず、ス

トレプトマイシン0.1 g/l、ペニシリンG 50,000 U/l、非働化牛胎児血清(GIBCO)を10%添加したRPMI 1640培養液(培養液)でPBMCを 3×10^6 /mlの濃度に調整した。これを200 μ lずつ単独で、あるいは至適量のTT抗原(Division of Biologic Laboratories, Commonwealth of Massachusetts Department of Public Health, Boston, MA, U.S.A.) 25 ng/mlを添加してU型マイクロプレート(Nuncclon Delta)(Nunc, Roskilde, Denmark)にそれぞれ6穴ずつ分注し、37°C、100%湿度、5% CO₂ in airの条件下で培養を行った。培養4日目に培養上清(4日目上清)を採取し、RPMI 1640培養液でPBMCを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。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。

つぎに、4日目上清中のIgG抗TT抗体が*in vitro*で産生されたものか否かを検討した。具体的には、ワクチン初回接種後、case 1では4週目、case 3では3週目のPBMCを培養開始時からTT抗原とともに蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミド(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) 50 μ g/mlの存在下で培養を行った。また、12日目上清中のIgG抗TT抗体が、培養5日目以降に産生されたものか否かを検討するために以下の実験を行った。Case 1はワクチン初回接種後4週目、case 2とcase 3はワクチン初回接種後8週目にPBMCを採取し、これをTT抗原25 ng/mlとともに培養し、4日目上清採取後シクロヘキシミド50 μ g/mlを加えてさらに培養を継続した。

V. IgG抗TT抗体の測定

血清および上清中のIgG抗TT抗体はLumら¹⁵⁾の方法に準じて酵素結合免疫吸着剤検定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)によって測定した。まず、pH 9.6の0.05 M炭酸緩衝液で5 μ g/mlの濃度に調整したTT抗原を100 μ lず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吸着させた。ついで、0.05% Tween 20(Sigma)を添加したpH 7.2、浸透圧280 mOs/kgのリン酸緩衝食塩水(phosphate buffered saline-Tween, PBS-Tween)で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 μ lずつ加えて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。

10倍の稀釈系列で段階稀釈した被検血清100 μ lあるいは培養上清100 μ lを測定用プレートに加えて

37°Cで2時間反応させ、反応終了後PBS-Tweenで3回洗浄した。さらに、抗体を反応させた上記の測定用プレートに2次抗体としてpH 6.6の10mM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 μ 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、H₂O₂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 g/lの濃度に溶解した溶液を100 μ lずつ加えた。室温で30分間反応させ、反応終了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、アフィニティ・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)により得られた標準曲線から求めた。なお、標準曲線は異なる機会に数回作製したが、いずれの場合もほぼ同様であった。

VI. 統計学的検討

統計学的処理は、等分散性の検定の後StudentまたはWelchのt検定で行い、 $p < 0.05$ 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血清中IgG抗TT抗体価

ELISA法の標準曲線(図1)から、本法を用いたIgG抗TT抗体の測定下限値は1.6 ng/mlで、その

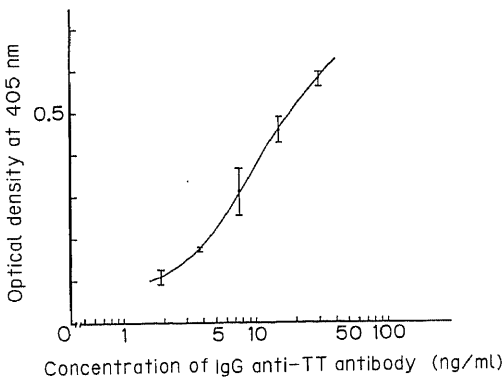


Fig. 1. A standard curve for the determination of IgG anti-TT antibody. Concentrations of the standard anti-TT antibody at various dilutions were measured by ELISA. Each value represents the mean \pm standard deviation (M \pm SD) in triplicate measurements.

ODは0.10であった。したがって、ODが0.10以上を示す最高希釈濃度を血清抗体価とした。破傷風の既往およびTTワクチン接種歴のない34例の血清抗体価は、1:1が3例、1:10が6例、1:100が25例で、1:1000以上を示した者は1例も認められなかった。以上の結果から、血清抗体価1:100以下をIgG抗TT抗体陰性と判断した。

II. TTワクチン接種後のin vivo IgG抗TT抗体産生

TTワクチン接種後のin vivo IgG抗TT抗体産生の経時的变化を明らかにするために、TTワクチンを接種した6例における血清中IgG抗TT抗体価を経時的に測定した。血清中IgG抗TT抗体は、TTワクチン接種前には全例陰性を示したが、初回接種後1~5週目で全例共に陽性化した(図2)。血清抗体価の推移をみると、case 1, 2, 3, 5, 6では3~5週目で最高値を示し、その後変動を示しながら低下してゆき15週目には陰性となった。しかし、case 4では13週目以降にかえって抗体価が上昇し始め、17週目に最高値を示し、その後変動しながら低下して36週目には陰性化した。

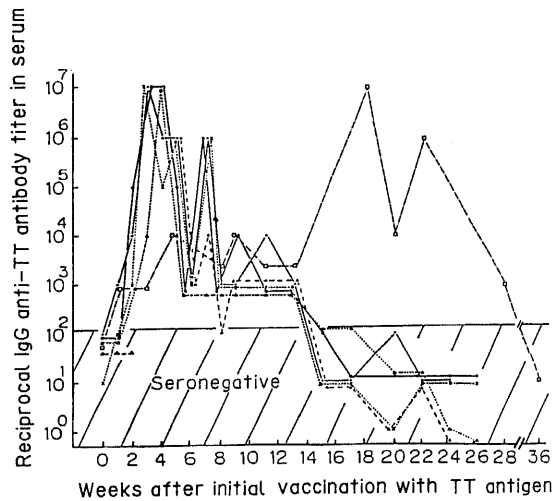


Fig. 2. Changes in IgG anti-TT antibody titers in the human serum after the primary vaccination. Data are shown in reciprocals of the sequential ten-fold dilutions of the serum. The serum antibody titers of 10^2 or less was estimated seronegative and those of 10^3 or more seropositive.

●—●, case 1; ○—○, case 2; ×---×, case 3; □---□, case 4; ▲---▲, case 5, △---△, case 6. Vaccination with TT antigen was performed on 0 and 1 weeks in case 5, on 0, 1 and 3 weeks in cases 1, 2, 3 and 4, and on 0, 1, 3 and 13 weeks in case 6.

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

前述した様に ELISA 法で、OD が 0.10 以上を示すものを *in vitro* IgG 抗 TT 抗体陽性と判断した。TT ワクチン未接種 20 例における PBMC の TT 抗原添加および無添加培養で得られた 4 日目上清の OD は、それぞれ 0.018 ± 0.013 , 0.017 ± 0.012 (mean \pm SD) であり、また 12 日目上清の OD はそれぞれ 0.013 ± 0.013 , 0.012 ± 0.013 であった。以上のように、TT ワクチン未接種時における *in vitro* 特異的抗体産生は全例認められなかった。

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

1. 4 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体

TT ワクチン接種後の 4 日目上清中の *in vitro* IgG 抗 TT 抗体産生の経時的変化を明らかにするために、TT ワクチンを接種した 6 例について、TT 抗原を添加した培養 4 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体を経時的に測定した (表 1)。Case 1, 2, 3, 4, 5 では、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、5~6 週目で消失した。Case 6 では 11 週目まで 1 度も検出されなかったため 13 週目に

Table 1. Production of IgG anti-TT antibody in supernatants of 4-days culture of PBMC* in the presence of TT antigen and period after initial vaccination with TT antigen

Case	Number of IgG anti-TT antibody-positive cultures among 6 cultures of PBMC tested							
	Weeks after initial vaccination with TT antigen							
	0**	1**	2	3**	4	5	6, 7, 8, 9, 11, 13**, 15, 17, 20, 22, 24, 26, 28, 36	
1	0	0	6	6	6	0	0****	
2	0	0	0	6	6	0	0****	
3	0	0	6	6	6	0	0****	
4	0	0	nt***	2	nt	0	0*****	
5	0	0	1	nt	nt	1	0*****	
6	0	0	0	0	0	0	0****	

*Peripheral blood mononuclear cells.

**Vaccination with TT antigen was performed on 0 and 1 weeks in case 5, on 0, 1 and 3 weeks in cases 1, 2, 3 and 4, and on 0, 1, 3 and 13 weeks in case 6.

***not tested.

****The test was not performed on 28 and 36 weeks.

*****The test was not performed on 6, 7, 15, 24 and 26 weeks.

*****The test was not performed on 26, 28 and 36 weeks.

Table 2. Production of IgG anti-TT antibody in supernatants of 4-days culture of PBMC* in the absence of TT antigen and period after initial vaccination with TT antigen

Case	Number of IgG anti-TT antibody-positive cultures among 6 cultures of PBMC tested												
	Weeks after initial vaccination with TT antigen												
	0**	1**	2	3**	4	6	7	8	11	13**	15	17	20
1	0	nt***	nt	6	6	nt	0	0	0	0	0	nt	nt
2	0	nt	nt	6	nt	nt	0	0	0	0	0	nt	nt
3	0	nt	nt	6	6	0	nt	0	0	0	0	0	0
4	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
5	0	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0	0	nt	0	0	nt
6	0	nt	nt	nt	0	nt	nt	0	0	nt	0	nt	nt

*, **, *** Refer to the footnotes of Table 1.

TT ワクチンの追加接種を行ったが、それ以後も上清中の IgG 抗 TT 抗体産生は認められなかった。

一方, *in vitro* IgG 抗 TT 抗体産生における抗原依存性の有無を明らかにする目的で, TT 抗原を添加せずに培養を行い, その 4 日目上清中 IgG 抗 TT 抗体産生の経時的変化を, 主に case 1, 2, 3 について検討した。表 2 から明らかなように, 4 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生は, 培養系への TT 抗原の添加の有無にかかわらず認められた。また, TT 抗原添加および無添加培養における 4 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生量を 6 ウェルの平均値で全例について検討した結果, TT 抗原を添加した場合抗体産生量が少ない傾向が認め

られた (表 3)。

つぎに, TT 抗原刺激によって *in vitro* で抗体を産生する B 細胞が蛋白合成を必要とするか否かを case 1 および 3 の PBMC を用い検討した。TT 抗原添加培養系において, 培養開始時にシクロヘキシミド 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えた系と加えなかった系における 4 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生量を測定した。その結果は表 4 に示されるように, シクロヘキシミドを培養系へ添加することにより *in vitro* IgG 抗 TT 抗体産生は認められなくなった。

2. 12 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体

TT ワクチン接種後の 12 日目上清中の *in vitro*

Table 3. Concentration of IgG anti-TT antibody in the supernatants of 4-days cultures of PBMC with or without TT antigen

Case	Presence of TT antigen in culture	Concentration (ng/ml) of IgG anti-TT antibody produced in 6 cultures of PBMC tested			
		Weeks after initial vaccination with TT antigen			
		2	3	4	5
1	-	nt**	27.7 \pm 6.3	20.8 \pm 2.4	nt
	+	11.0 \pm 1.3*	21.8 \pm 8.9	7.3 \pm 0.5#	0
2	-	nt	>40.0	nt	nt
	+	0***	>40.0	>40.0	0
3	-	nt	4.7 \pm 0.4	8.3 \pm 1.0	nt
	+	5.9 \pm 0.6	3.4 \pm 0.5#	3.7 \pm 0.7#	0
4	-	nt	nt	nt	nt
	+	nt	0.6 \pm 0.9	nt	0
5	-	nt	nt	nt	nt
	+	0.5 \pm 1.2	nt	nt	0.5 \pm 1.0
6	-	nt	0	nt	nt
	+	0	0	0	0

*Mean \pm S.D. (n=6).

**Not tested.

***Less than 1.6 ng/ml.

#p<0.001 vs. - by Student or Welch t-test.

Table 4. Effect of cycloheximide on *in vitro* production (4-days culture) of IgG anti-TT antibody

Case	Addition of cycloheximide (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to culture	Concentration (ng/ml) of IgG anti-TT antibody in supernatants of 4-days culture in well No. of						Mean \pm S.D.
		1	2	3	4	5	6	
1	-	6.6	6.7	7.5	7.7	7.7	7.8	7.3 \pm 0.5
	+	0	0	0	0	0	0	0.0 \pm 0.0#
3	-	2.7	3.0	3.1	3.6	3.9	4.0	3.4 \pm 0.5
	+	0	0	0	0	0	0	0.0 \pm 0.0#

PBMC from cases 1 and 3 were obtained on 4 and 3 weeks after initial vaccination with TT antigen, respectively. PBMC were cultured with TT antigen.

#p<0.001 vs. - by Welch t-test.

IgG 抗 TT 抗体産生の経時的变化を明らかにするために、TT ワクチンを接種した 6 例について、培養系へ TT 抗原を添加した 12 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体を経時的に測定した (表 5)。Case 1, 2, 3 では、初回接種後 2~4 週目から上清中に IgG 抗 TT 抗体が検出されるようになり、5~6 週目でいったん消失したが 7 週目に再び出現し、そして 9 週目に再び認められなくなった。しかし、case 1 では IgG 抗 TT 抗体は 11, 13, 17 週目にも検出され、20 週目以降は完全に認められなくなった。Case 4, 5 では初回接種後 9~11 週

目に初めて検出されるようになり、15 週目以降は消失した。Case 6 では 4 日目上清と同様に 1 度も検出されなかった。

さらに、12 日目上清中に検出される *in vitro* IgG 抗 TT 抗体産生における抗原依存性の有無を明らかにする目的で、TT 抗原を添加せずに培養を行い、その 12 日目上清中 IgG 抗 TT 抗体産生の経時的变化を検討した。表 2 に示した TT 抗原無添加 4 日目上清の場合と同じ時期について 12 日目上清中 IgG 抗 TT 抗体産生を検索したが抗体は全く認められず、12 日目上清

Table 5. Production of IgG anti-TT antibody in supernatants of 12-days culture of PBMC* in the presence of TT antigen and period after initial vaccination with TT antigen

Case	Number of IgG anti-TT antibody-positive cultures among 6 cultures tested														
	Weeks after initial vaccination with TT antigen														
	0**	1**	2	3**	4	5	6	7	8	9	11	13**	15	17	20, 22, 24, 26, 28, 36
1	0	0	6	3	6	3	0	2	6	0	6	5	0	1	0****
2	0	0	0	5	6	0	0	6	6	0	0	0	0	0	0****
3	0	0	0	0	3	0	0	6	1	0	0	0	0	0	0****
4	0	0	nt***	0	nt	0	nt	nt	nt	5	4	1	nt	0	0*****
5	0	0	0	nt	nt	0	0	0	0	0	3	6	0	0	0*****
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0****

*, **, *** Refer to the footnotes of Table 1.

**** The test was not performed on 28 and 36 weeks.

***** The test was not performed on 24 and 26 weeks.

***** The test was not performed on 26, 28 and 36 weeks.

Table 6. Concentration of IgG anti-TT antibody in the supernatants of 12-days cultures of PBMC with or without TT antigen

Case	Presence of TT antigen in culture	Concentration (ng/ml) of IgG anti-TT antibody produced in 6 cultures of PBMC tested									
		Weeks after initial vaccination with TT antigen									
		2	3	4	5	7	8	9	11	13	17
1	-	nt**	0***	nt	nt	0	0	nt	0	0	nt
	+	5.2±1.3*	1.7±1.8	9.6±2.7	2.4±2.6	3.3±5.6	>40.0	0	17.5±3.3#	8.7±5.2#	1.2±2.6
2	-	nt	0	nt	nt	0	0	nt	0	0	nt
	+	0	4.1±1.9#	>40.0	0	12.8±5.3#	15.2±8.1#	0	0	0	0
3	-	nt	0	0	nt	0	0	nt	0	0	0
	+	0	0	1.9±1.9	0	13.4±2.7	1.6±3.5	0	0	0	0
4	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
	+	nt	0	nt	0	nt	0	3.1±2.2	2.2±1.7	1.0±2.2	0
5	-	nt	nt	nt	nt	nt	0	nt	0	nt	0
	+	0	nt	nt	0	0	0	0	1.5±1.5	6.6±1.3	0
6	-	nt	0	nt	nt	0	0	nt	0	nt	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Mean±S.D. (n=6)

** Not tested.

*** Less than 1.6 ng/ml.

#p<0.001 vs. -by Student or Welch t-test.

中の IgG 抗 TT 抗体産生は TT 抗原存在下で培養した場合のみに認められることが判った。(表 6)。

次いで、TT 抗原刺激によって培養 5 日目以降に *in vitro* で抗体を産生する B 細胞が蛋白合成を必要とするか否かを検討した。TT 抗原添加培養系において、4 日目上清採取後にシクロヘキシミド 50 $\mu\text{g/ml}$ を加えた系と加えなかった系における 12 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生量を測定した。その結果は、表 7 に示されるように、シクロヘキシミドを培養系へ添加することにより *in vitro* IgG 抗 TT 抗体産生は認められなくなった。

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、血清中の抗原特異的抗体の出現にほぼ対応して *in vitro* においても抗原特異的抗体産生を検出できることが明らかとなった。しかも、この TT 抗原特異的抗体産生は、検出可能となる時期や抗体産生条件の違いによって 2 種類に区別されることが示唆された²¹⁾。

まず、4 日目上清中の *in vitro* 抗体産生は、血清抗体価の上昇とほぼ一致して初回接種後 2~3 週目より認められるようになり、また培養系への TT 抗原添加の有無に関係なく IgG 抗 TT 抗体が検出された。このことは、4 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生は抗原非依存性であることを示唆している。さらに、この *in vitro* 抗体産生は、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミドの添加によって消失したことから、血清中からの抗体の移入ではなく、*in vitro* において自然に末梢

血 B 細胞によって産生されたものと考えられる。

Stevens ら²²⁾、Geha²³⁾ は TT の 2 次免疫において、追加免疫後 5 日以内に T 細胞や PWM の非存在下で 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。また、Kishimoto ら²⁴⁾ 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、その前後で自然に 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。したがって、今回の検討で明らかとなったように、TT 初回免疫時にも 2 時免疫の場合と同様に、*in vivo* で TT 抗原刺激によって活性化され、さらに抗体産生細胞へ分化した B 細胞が末梢血液中を循環する時期が一時的に存在するものと予想される。しかし、2 次免疫の場合とはやや異なり、抗 TT 抗体産生細胞の末梢血液中への出現は 2 次免疫の場合より遅れ、逆に末梢血液中に出現後 1~3 週間と比較的長期間末梢血液中に存在すると考えられる。

一方、12 日目上清中の *in vitro* 抗体産生が、培養系へ TT 抗原を添加した場合のみ認められた点は注目される。このことは、12 日目上清中の IgG 抗 TT 抗体産生が抗原依存性であることを示唆している。さらに、この *in vitro* 抗体産生は、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミドの存在下では検出されず、また case 1, 2, 3 の接種後 3 週目の抗原無添加の系および case 5 の接種後 2 および 5 週目の抗原添加の系などでは、4 日目上清中に検出された IgG 抗 TT 抗体が 12 日目上清では認められなかった。これらのことより、12 日目上清中に認められる IgG 抗 TT 抗体は 4 日目

Table 7. Effect of cycloheximide on *in vitro* production (12-days culture) of IgG anti-TT antibody

Case	Addition of cycloheximide (50 $\mu\text{g/ml}$) to culture	Concentration (ng/ml) of IgG anti-TT antibody in supernatants of 12-days culture in well No. of						Mean \pm S.D.
		1	2	3	4	5	6	
1	-	6.5	7.9	8.3	8.7	11.7	14.5	9.6 \pm 2.7
	+	0	0	0	0	nt*	nt	0.0 \pm 0.0 [#]
2	-	5.7	7.4	11.1	17.0	21.0	29.0	15.2 \pm 8.1
	+	0	0	0	0	0	0	0.0 \pm 0.0 ^{##}
3	-	0	0	0	0	0	9.5	1.6 \pm 3.5
	+	0	0	0	0	0	0	0.0 \pm 0.0

PBMC from cases 1, 2 and 3 were obtained on 4, 8 and 8 weeks after initial vaccination with TT antigen, respectively. PBMC were cultured with TT antigen for 4 days. After harvesting the culture supernatant medium containing TT antigen, cycloheximide was added to well and cultured for additional 8 days.

* $p < 0.01$ vs. - by Welch t-test.

$p < 0.001$ vs. - by Welch t-test.

上清中の自然に産生された抗体の移入ではなくて、TT 抗原刺激により *in vitro* で末梢血 B 細胞の TT 抗原特異的抗体産生細胞への分化が誘導され、培養 5 日目以降に抗体産生細胞に成熟したものと推定される。Shiobara ら¹⁸⁾、Callard ら²⁵⁾ の報告によると、*in vitro* における抗原刺激による抗原特異的抗体産生には、ヘルパー T 細胞活性とともに記憶 B 細胞の存在が必須であるという。したがって、今回の検討において *in vitro* で TT 抗原刺激によって TT 抗原特異的抗体産生細胞へ分化した細胞は、IgG 抗 TT 抗体産生前駆細胞、すなわち TT 抗原特異的記憶 B 細胞と考えられる。

Stevens ら²⁶⁾ および Saxon ら²⁷⁾ は、TT の 2 次免疫における PWM を用いた実験系においては、自然に IgG 抗 TT 抗体を産生する B 細胞がまず末梢血液中に出現し、そしてそれが末梢血液中から消失した後の追加免疫後 14 日目以内に、PWM と T 細胞に反応して IgG 抗 TT 抗体を産生する B 細胞が末梢血液中に出現するようになり、60 日目までには消失したと報告している。著者の成績では、TT 抗原特異的記憶 B 細胞の出現は、個体差があるものの、2 次免疫の場合のかれらの報告に比べて遅くかつ長期間続く傾向があり、また自然に IgG 抗 TT 抗体を産生する B 細胞と同時にまたは遅れて出現するという種々の違いが認められた。この違いには、*in vitro* における PWM と TT による抗原刺激の差異、抗原特異性の異なる細胞を評価している可能性、などの関与も考えられる。

興味あることに、case 1, 2, 3 では 12 日目上清中に IgG 抗 TT 抗体が検出されるようになってから途中でいったん陰性化し、その後再び陽性化している。その原因は不明であるが、可能性としては、1) *in vitro* において IgG 抗 TT 抗体産生を抑制し、追加免疫後 2 週目から 4 カ月目まで血清中に検出されたと報告されている抗イディオタイプ抗体²⁸⁾²⁹⁾ による影響、2) 追加免疫後 20~60 日頃に出現する抗原特異的サプレッサー T 細胞や B 細胞機能の低下²⁶⁾ による影響、3) 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、などが考えられる。

Case 6 では、血清抗体価は十分な反応を示したにもかかわらず、*in vitro* での抗体産生は認められなかった。このように免疫後 *in vitro* での抗原特異的抗体産生の認められなかった症例については他にも報告されている³⁰⁾。その理由として、1) *in vitro* で抗体産生可能な B 細胞の末梢血液中における頻度が非常に低い、2) そのような B 細胞が末梢血液中に存在していない³¹⁾、3) 末梢血液中にはそのような B 細胞が存在しているが、その *in vitro* における抗体産生能または

抗原に対する反応性が弱いために検出されなかった、などの可能性が考えられる。

本研究の成績から、TT ワクチン接種後早期に自然に IgG 抗 TT 抗体を産生する B 細胞が血清抗体価の上昇とほぼ一致して末梢血液中に出現し、ついで TT 抗原特異的記憶 B 細胞が出現するという可能性が示唆された。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^{25)32)~34)} が次第に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維持メカニズム³⁵⁾³⁶⁾ 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予想される。

結 論

健康成人を対象として、TT による初回免疫後の *in vivo* および *in vitro* における TT 抗原特異的抗体 (IgG 抗 TT 抗体) 産生の経時的変化について検討した結果、以下のような成績を得た。

1. 免疫前には、全例血清および末梢血単核球培養上清中に IgG 抗 TT 抗体は検出されなかった。
2. 血清抗体価は TT ワクチン初回接種後 1~5 週目に陽性化し、15~36 週目に陰性化した。
3. 6 例中 5 例で、血清抗体価の陽性化にほぼ一致して末梢血 B 細胞の *in vitro* 抗原特異的抗体産生が認められるようになった。
4. この *in vitro* 抗原特異的抗体産生は、抗原非依存性と抗原依存性の 2 つのタイプに区別され、前者は初回接種後 2 週目から認められるようになり、6 週目には消失したが、後者は個体差があるものの初回接種後 2~11 週目に出現し始め、9~20 週目には消失した。
5. 検討した 6 例中 1 例では、血清抗体価の陽性化を認めたが、*in vitro* 抗原特異的抗体産生は認められなかった。

以上の成績から、TT による初回免疫後初期に血清抗体価の陽性化とほぼ一致して、自然に IgG 抗 TT 抗体を産生する B 細胞が末梢血液中に一過性に出現し、それと同時にまたはそれより遅れて血清中に IgG 抗 TT 抗体が検出される時期に一致して、TT 抗原特異的記憶 B 細胞が比較的長期間末梢血液中を循環することが示唆された。

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、御援助を戴いた金沢大学第三内科原田実根講師および塩原信太郎博士、ならびに多大な御協力を戴いた金沢大学第三内科免疫研グループの諸先生および教員室諸氏、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21回日本移植学会総会(1985)および第15回日本免疫学会総会(1985)において発表した。

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, 冨野新八郎, 藤原弘一, 河野文夫, 岸本 進, 山本治郎: 免疫不全症における特異抗体産生能の 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. USA*, **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) 木村三生夫: 百日咳・ジフテリア・破傷風, 治療

- 学, 9, 776-780 (1982).
- 20) 海老沢 功: 破傷風, からだの科学, 増刊 13, 119-121 (1982).
- 21) 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).
- 22) 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).
- 23) Geha, R. S.: Dynamics of human circulating antigen reactive cells following secondary immunization with tetanus toxoid. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 19, 196-205 (1981).
- 24) 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).
- 25) 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).
- 26) Stevens, R. H. & Saxon, A.: Immunoregulation in humans. Control of antitetanus toxoid antibody production after booster immunization. *J. Clin. Invest.*, 62, 1154-1160 (1978).
- 27) 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).
- 28) 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).
- 29) Saxon, A. & Barnett, E.: Human auto-anti-idiotypes regulating T cell-mediated reactivity to tetanus toxoid. *J. Clin. Invest.*, 73, 342-348 (1984).
- 30) Harley, J. B. & Fauci, A. S.: Cyclosporine modulates the human *in vitro* T-dependent antigen-induced synthesis of specific antibody. *Transplant. Proc.*, 15, 2315-2320 (1983).
- 31) Mitchell, D. M., Fitzharris, P., Knight, R. A. & Schild, G. C.: Kinetics of specific *in vitro* antibody production following influenza immunization. *Clin. exp. Immunol.*, 48, 491-498 (1982).
- 32) 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).
- 33) Clark, P., Normansell, D. E., Innes, D. J. & Hess, C. E.: Lymphocyte subsets in normal bone marrow. *Blood*, 67, 1600-1606 (1986).
- 34) Anderson, K. C., Roach, J. A., Daley, J. F., Schlossman, S. F. & Nadler, L. M.: Dual fluorescence analysis of human B lymphocytes: Phenotypic examination of resting, anti-immunoglobulin stimulated, and *in vivo* activated B cells. *J. Immunol.*, 136, 3612-3618 (1986).
- 35) 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).
- 36) 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 Antibody Responses in Man after Primary Immunization with Tetanus Toxoid Minoru Otsuka, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **96**, 142—152 (1987)

Key words: primary immunization, tetanus toxoid, IgG anti-tetanus toxoid antibody, spontaneous antigen-specific antibody-producing B cell, antigen-specific memory B cell

Abstract

In an attempt to know the *in vivo* and *in vitro* antigen-specific antibody production in man, immunoglobulin G (IgG) anti-tetanus toxoid (TT) antibody responses in the serum and in cultures were studied in 6 healthy adults who were immunized for the first time with TT vaccine. Sera and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained sequentially from those subjects after the primary immunization. For anti-TT antibody responses *in vitro*, PBMC were cultured with or without TT antigen and supernatants were harvested after 4 days of culture (4-days supernatants). Cultured cells were washed, resuspended in the culture media and further cultured without TT antigen. After culturing for 8 days, supernatants were collected (12-days supernatants). Supernatants were stored at -20°C until the measuring of antibody production. Concentrations of IgG anti-TT antibody in serum and supernatants were determined by the use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Before immunization, anti-TT antibody was not detected both in the serum and in the 4-days and 12-days supernatants. Serum antibody titers became positive in 1-5 weeks after the primary immunization but turned negative during 15 to 36 weeks. *In vitro* production of IgG anti-TT antibody by PBMC was observed in 5 of 6 immunized subjects during the period when the serum antibody titers remained positive. IgG anti-TT antibody in the 4-days supernatants were observed regardless of the absence or presence of TT antigen in cultures, whereas those in the 12-days supernatants were detected only when TT antigen was present in cultures. These findings indicate two types of *in vitro* IgG anti-TT antibody production: 1) antigen-independent antibody production emerged from 2 weeks after the immunization and disappeared in 6 weeks; 2) antigen-dependent antibody production was observed from 2 to 11 weeks after the immunization and disappeared in 9-20 weeks. These observations suggest that spontaneous IgG anti-TT antibody producing B cells are circulating in the peripheral blood at least when the serum antibody titers are positive, while TT-specific memory B cells may circulate in the peripheral blood simultaneously or shortly after the disappearance of these antibody producing B cells.