レバミゾールによるEロゼット形成能増強因子の誘導と作用機序に関する研究

レバミゾールによるＥロゼット形成能増強因子の誘導と作用機序に関する研究

金沢大学医学部小児科学教室（主任：谷口　昂教授）
関　　秀　俊

（昭和56年11月13日受付）

Key word　Partial DiGeorge syndrome, Levamisole, Ｅロゼット形成能増強因子，胸腺ホルモン

Levamisole（以下 LMS）は駆虫剤として開発されたが，1970年代に入ってから免疫賦活作用ないし免疫調節作用があることが知られるようになった[1]．LMSは種々の抗原に対する遅延型過敏反応を回復し[2)3)]，減少したＥロゼット形成細胞（以下 ERFC）を増加させる[4)5)]など主にＴ細胞とマクロファージに作用するとされており，種々の疾患の治療に応用されている．また最近LMSには，未熟Ｔ細胞を成熟Ｔ細胞へ分化させる作用があることが明らかにされ[6)~9)]，その胸線ホルモン類似作用が注目されるようになった．そしてその作用機序として，LMS自体には胸線ホルモン様活性はなく，LMSが血漿因子を誘導することによりＴ細胞分化を促進すると考えられている[8)10)]．

DiGeorge症候は[11)12)]，第３および第４鰓弓の発生異常による胸腺と副甲状腺の無形成または低形成に基づく疾患で，末梢血ERFCの減少，細胞性免疫能低下，副甲状腺機能低下，心および顔面外表奇形を特徴としている．本症候はcomplete formとpartial formに大別されるが[13)14)]，多数を占めるpartial DiGeorge症候は胸腺組織の不完全欠如で，残存する胸腺はHassall小体も存在し正常組織像を呈することが多い．また免疫学的機能もかなり保たれており，in vitroにおけるリンパ球のmitogenに対する反応性や，リンパ球混合培養（以下MLC）反応も正常に近く，移植片対宿主（以下GVH）反応も起り難いとされており，胸腺ホルモンによる治療も期待されている．そしてこのような胸腺ホルモン治療の成功例では，in vitroでも胸腺ホルモンによりＥロゼット形成能の増強がみられ，本症候ではすでにわずかながらでも胸腺で影響を受けた未熟Ｔ細胞が存在しており，胸腺ホルモン投与により成熟Ｔ細胞へ分化すると考えられている[15)~17)]．Partial DiGeorge症候の治療にLMSを使用した報告はまだみられないが，胸腺ホルモンであるthymosinやthymopoietinの代りに胸腺ホルモン類似作用をもっとされるLMSを投与することにより，ERFCの増加やその他の細胞性免疫能の改善が期待される．今回両親の同意を得て，partial DiGeorge症候の乳児にLMSを投与し，ERFCや他の免疫学的パラメータの変動と，さらに血漿中に誘導されるＥロゼット形成能増強因子とその作用機序について検討した．

対象および方法

対象は在胎41週，生下時体重3800ｇの男児で，生下時より両眼隔離症，耳介奇形，両側口唇裂，チアノーゼ，心雑音，鎖肛が認められた症例である．生後29時間後鎖肛の手術を受けたが，その時低カルシウム血症（1.8～3.1 mEq/L）を指摘された．術後新鮮血30 mlを輸血されたが，その後GVH反応はみられなかった。胸部レントゲン写真で胸腺陰影は認められず，心カテーテル検査で総動脈幹残遺と肺動脈低形成が確認された．染色体検査の結果は正常であった．低カルシウム血症と高リン血症は，ビタミンＤとカルシウム剤投与で改善がみられたが，副甲状腺ホルモンは0.1 ng/ml以下であった．入院後も特に易感染性はみられなかった．

免疫学的検査成績では，ERFCが20％，補体レセプ

Induction of E-Rosette-Promoting Factor in Human Plasma by Levamisole. **Hidetoshi Seki,** Department of Pediatrics (Direct Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University,

ター陽性細胞が62%，表面免疫グロブリン陽性細胞(以下s-Ig(+)cell)が46%で，IgG 660 mg/dl, IgM 238 mg/dl, IgA 24 mg/dl, IgE 42 U/ml, $C_3$72 mg/dl, $C_4$28 mg/dlであった．遅延型過敏皮膚反応では，tuberculinのpurified protein derivative, candida, streptokinase/streptodornaseで陰性で，dinitrochlorobenzeneでも感作されなかった．リンパ節生検像は，皮質にリンパ濾胞が認められ髄索にも多数リンパ球が存在するが，胸腺依存域は極めてリンパ球が減少していた．さらにDr. J. J. Twomeyの好意によるthymic-hormone activityの測定[18]では，1.6 ng thymopoietin equivalent/mlと著明に低下していた(正常域10.6〜16.2 ng/ml)．

1．リンパ球の分離

ヘパリン加末梢血をリン酸緩衝生理食塩水で2倍に希釈後，Lymphoprepに重層し比重遠心法により中間層よりリンパ球を採取した．3回洗浄後RPMI-1640培養液(GIBCO)にてリンパ球濃度を1×10^7/mlに調整した．

2．T細胞とB細胞の検出と分離

T細胞は，neuraminidase(10 u/ml, Behringwerke)で処理した羊赤血球を用いたEロゼット形成法にて検出した[19]．また未分画リンパ球を羊赤血球でEロゼット形成後，Lymphoprep比重遠心法にてpelletにERFCを分離し，0.01 M Tris 0.84% NH_4 Cl溶液で羊赤血球を溶血させT細胞に富む合画(純度95%以上)を得た．また同時に中間層よ Eロゼット陰性細胞(以下non-ERFC)を分離した(ERFCの混入は0.5%以下)．B細胞の検出は，FITC標識ウサギ抗ヒト免疫グロブリン(Behringwerke)を用いた免疫螢光法[20]により，s-Ig(+)cellをB細胞とした．

3．各mitogenに対する反応性とone-way MLC反応

2×10^5個の末梢血リンパ球(以下PBL)を，10%非働化胎児ウシ血清を含むRPMI-1640培養液0.5 mlに浮遊させ，phytohaemagglutinin-P(以下PHA-P, Difco Lab) 15 μg/ml濃度，concanavalin A(以下Con A, Difco Lab) 10 μg/ml濃度の刺激にて，37°C5% CO_2濃度で3日間培養した．培養終了24時間前に^{3}H-thymidineを1 μCi/ml添加し，液体シンチレーションカウンターにてthymidine uptakeを測定した．One-way MLC反応では，37°Cで30分間mitomycin C(50 μg/ml)処理した2×10^5個のstimulator cellと，等量のresponder cellを10%非働化ヒトAB型血清加培養液に混合後5日間培養し，前述と同様な方法でthymidine uptakeを測定した．

4．LMS投与後誘導される血漿因子

Partial DiGeorge症候の乳児には2.5 mg/kgのLMSを，20歳から40歳までの健康成人5名と胸腺摘出後1年以上経た重症筋無力症の患者4名には150 mgのLMSをそれぞれ1回投与し，経時的に血漿を採取した．血漿は56°C30分で非働化し，collodion bag(Sartorius SM 13201, m. w. cut-off, 25,000)で濾過後，−20°Cで保存し血漿因子として使用した．さらに本因子の分子量を推定するために，LMS投与3日目の健康成人の血漿を，UM−10アミコン限外濾過膜(Amicon corp. m. w. cut-off, 10,000)とDM-5アミコン限外濾過膜(Amicon corp. m. w. cut-off, 5,000)を用いて分子量約10,000以下と5,000以下に分画した．また血漿を4°C24時間RPMI-1640培養液による透析を行なった．耐熱性を検討するためUM-10濾液を用い80°C10分の熱処理を行った．

5．Eロゼット形成能増強因子のassay

LMS投与中止後ERFCが低値になった時期の患児のPBL(10^7/ml)と，それぞれ得られた血漿因子を等量混合し，37°C 5% CO_2濃度で30分から18時間それぞれ培養した．その後培養液で3回洗浄し，羊赤血球でEロゼット形成させ，ERFCの増加を培養液とPBLのみのコントロールと比較した．また血漿因子の活性を検討するため，患児と健康成人のLMS投与3日目の血漿を用いて希釈試験を行なった．さらに同様の方法にて，LMS(Janssen Pharmaceutica) 10^{-5}〜10^{-7}Mとthymopoietin(以下TP, Dr. G. Goldstein[21]供与) 200 ng/mlのEロゼット形成増強能も検討した．

6．血漿因子のPHA-PとCon A反応に及ぼす影響

患児PBL(10^7/ml)または成人PBL(10^7/ml)を等量の血漿因子やTP(最終濃度200 ng/ml)とともに6時間または18時間培養した．その後培養液で洗浄しPHA-PやCon Aを添加し前述のごとくthymidine uptakeを測定しコントロールと比較した．

7．血漿因子の作用機序

前述の方法で分画された患児のnon-ERFCと血漿因子を反応させてもERFCの誘導はみられず，血漿因子が直接non-ERFCに作用するのではないことがわかった．細胞非交通性の直経0.45 μmの孔のあるMillipore membrane(Amicon corp)で隔てたModified Boyden chamber(Labo Science)を用い，上室に患児またはその両親や他人のERFC(0.15×10^6〜4.0×10^6)個を，下室には患児のnon-ERFC(5×10^5個)を入れ，血漿因子存在下で37°C5% CO_2濃度で15時間から18時間培養した．その後下室のnon-ERFCを培養液で洗浄し，羊赤血球でEロゼット形成させERFCの増加をコントロールと比較した．

成　　績

1. LMS 投与後の免疫学的パラメーターの変動

図1に示すように，生後7日目には47％あったERFC すなわちＴ細胞数比率は6週後には16％と著明に低下した．一方 s-Ig(+) cell すなわちＢ細胞数比率は40〜50％と増加しており主に IgM 陽性細胞であった．この時点で LMS (2.5 mg/kg/week) 投与を開始した．3週後には ERFC は51％に増加し，s-Ig (+) cell は31％に低下した．投与を中止とすると，3週後 ERFC は再び20％に減少し，s-Ig(+) cell は45％に増加した．LMS 再投与後も同様な変化が観察された．

PHA-P に対する反応性と one-way MLC 反応は，表1に示すように LMS 投与前においても同年令対照に比して持に低下していないが，Con A に対する反応性は対照の2分の1に低下していた．LMS 投与後，ERFC の増加に一致して PHA-P と Con A に対する反応性は増強する傾向がみられたが，one-way MLC 反応には変化がみられなかった．

2. **LMS によるＥロゼット形成能増強因子の誘導**

In vitro において LMS (10^{-5}〜10^{-7}M) で患児の骨髄細胞(結果は示してない)や PBL を培養しても ERFC の増加はみられない．しかし LMS 投与3日目の患児や健康成人の血漿で患児 PBL を培養すると，Ｅロゼット形成能の増強がみられた．血漿因子の反応時間を検討すると，図2に示すように6時間培養でＥロゼット形成能はプラトーに達するので，以下の実験では6時間培養することにした．患児と健康成人の血漿因子の活性は同程度と考えられ，図3に示すように希釈試験でもそれぞれ2分の1希釈まで活性が認められた．また結果は示していないが，この血漿因子は成人や臍帯血リンパ球のＥロゼット形成は増強しなかった．

3. **LMS 投与後の血漿因子活性の経時的変化**

図4に示すように，LMS 投与前の健康成人と胸腺摘出された重症筋無力症の血漿には少しＥロゼット形成増強能がみられるが，患児血漿中にはほとんど活性がみられない．LMS 投与後の健康成人や患児の血漿では7日間にわたり活性の増強がみられ，その最高値は3日目にあった．しかし胸腺摘出者では，LMS 投与による血漿因子の活性増強はみられなかった．また同時に Dr. J.J.Twomey[18]に依頼して測定した患児血漿の thymic

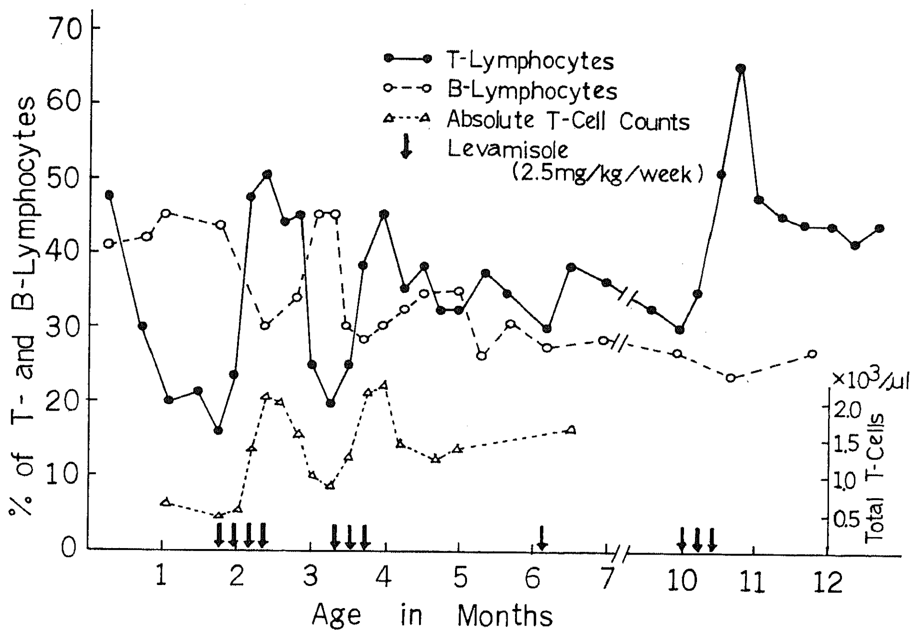

Fig. 1. Changing patterns in relative proportions of circulating T and B lymphocytes following levamisole treatment in a patient with partial DiGeorge syndrome. T cells were enumerated by E-rosette formation with neuraminidasetreated sheep erythrocytes and absolute number of circulating T cells were calculated on the basis of leukocyte differentials. B cells were detected with a direct immunofluorescent method by the use of polyvalent antisera.

- hormone activity は，投与前では 1.6 ng thymopoietin equivalent/ml と極めて低値であったが，投与 1 週後では 11.6 ng thymopoietin equivalent/ml と著明に増加した．

4．血漿因子の性状

血漿因子の活性は，図 5 に示すように 56°C30 分の非働化では不変だが，透析により消失した．また限外濾過の成績より，分子量約 5,000 から 10,000 の間の比較的低分子の物質であると考えられる．さらに 80°C10 分の熱処理後も失活しなかった．同時に行なった TP の E ロゼット形成増強能の実験より，血漿因子の活性は 200 ng/ml 濃度の TP と同等と考えられた．

5．血漿因子と TP の mitogen response に及ぼす影響

結果は示さなかったが，患児 PBL や成人 PBL を血漿因子で 8 時間培養しても，PHA - P や Con A 反応には変化がみられなかった．しかし 18 時間培養すると，図 6 に示すように患児 PBL の Con A 反応を著しく高めるとともに PHA - P 反応も増強した．一方 TP は患児 PBL の Con A 反応を高めるが，PHA - P 反応にはほとんど影響を与えなかった．血漿因子も TP も成人 PBL の反応性にはほとんど影響を及ぼさなかった．

6．血漿因子の作用機序

患児の non - ERFC を血漿因子で培養しても ERFC の増加はみられない．細胞非交通性の膜で患児の ERFC と non - ERFC を分画し，血漿因子と共に培養し non - ERFC の E ロゼット形成能の増強を検討すると，図 7 に示したように上室に患児 ERFC が存在すると，細胞数に比例して下室の non - ERFC 中の ERFC が増加した．しかし上室に両親や他人の ERFC が存在しても，non - ERFC の E ロゼット形成能の増強はみられなかった．

Table 1. Lymphocyte proliferative responses to mitogens and in the one-way mixed lymphocyte culture. Lymphocytes (2×10^5 /ml) of the patient and an age matched control were cultivated with PHA-P or Con A for 3 days and with allogeneic cells (2×10^5 /ml) treated with 50 μg mitomycin C/ml for 5 days. ^{3}H-thymidine (1 μCi/ml) was added to each culture 24 h before harvest and thymidine uptake was counted. Results were expressed as the means of counts per minute of triplicate lymphocyte cultures.

Age of patient (weeks)	Patient			Age matched control		
	PHA-P	Con A	not stimulated	PHA-P C	Con A	not stimulated
6	48,002	54,407	13,119	53,923	122,513	13,592
7	46,922	44,391	4,097			
8 *	37,348	34,734	8,418			
9 *	58,335	47,761	6,139	42,518	72,920	8,540
10 *	67,354	54,085	7,987			
12	40,732	30,064	5,948	35,847	65,474	6,181
22	52,324	38,491	6,182	38,684	60,771	5,576

Age of patient (weeks)	Patient		Control	
	Allogeneic cells	not stimulated	Allogeneic cells	not stimulated
6	18,645	7,500	11,276	1,330
7	21,951	8,069	22,410	1,105
8 *	39,635	5,906	26,679	4,280
9 *	17,312	3,637	21,513	6,278
22	21,225	6,681	19,186	5,246

*: During levamisole treatment

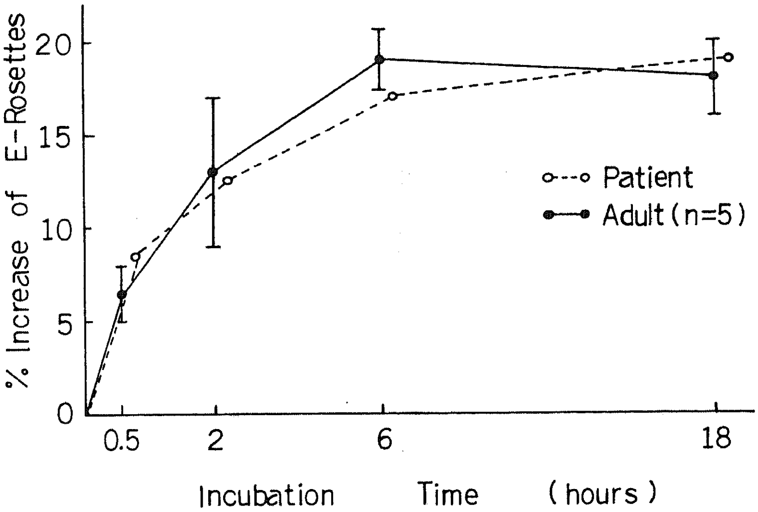

Fig. 2. Time course of the *in vitro* induction of E-rosettes by plasma factor isolated 3 days after levamisole administration. Lymphocytes were obtained from the patient in the levamisole-free period. Equal volumes of lymphocyte suspension and plasma factor were incubated. Percent increase of E-rosette was calculated by subtracting E-rosette percentage in control incubation in which phosphate-buffered saline was substituted for plasma factor. The results of 5 control plasma specimens were expressed as the means ± 1 S. D..

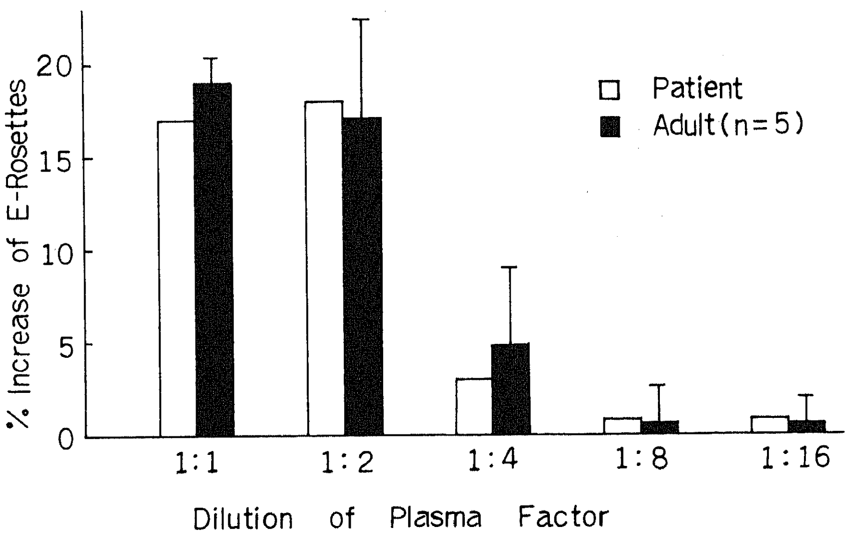

Fig. 3. Dilution of plasma factor and E-rosette-inducing ability. Plasma factor was diluted with phosphate-buffered saline and E-rosette induction assay was carried out, as described in the legend of Fig. 2., after a 6h-incubation. The results of 5 control specimens were expressed as the means ± 1 S. D. of percent increase of E-rosettes.

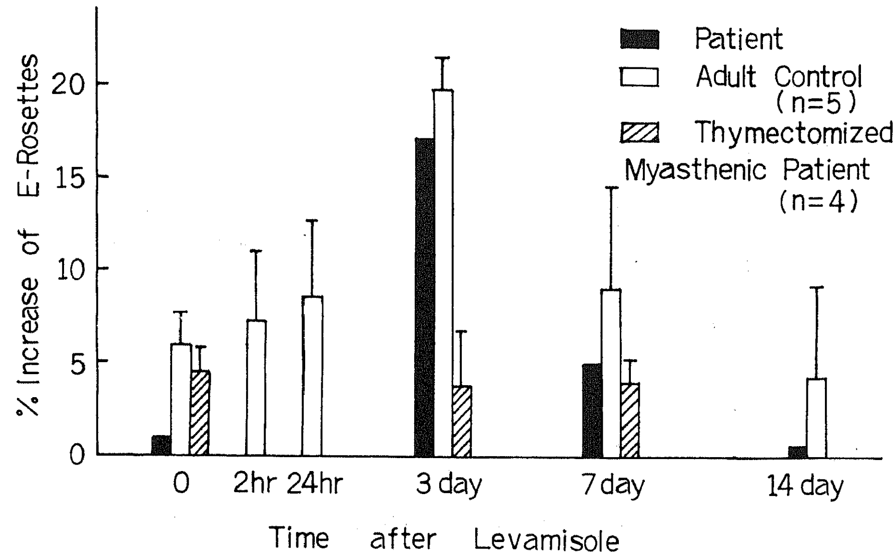

Fig. 4. E-rosette-promoting activity in plasma for patient's lymphocytes after a single oral dose of levamisole. Plasma factor was prepared sequentially after levamisole administration and stored at −20℃ until the use. After 6 hour incubation with patient's lymphocytes obtained in the levamisole-free period, percent increase in E-rosettes was calculated as described in the legend of Fig. 2. The results were expressed as the means ± 1 S. D. of percent increase of E-rosettes.

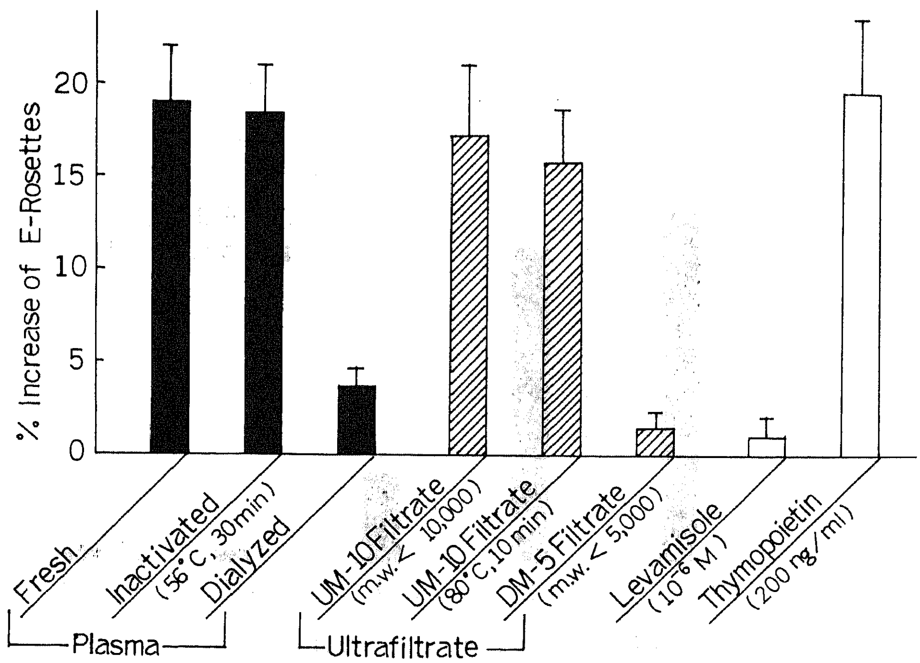

Fig. 5. Some characterization of levamisole-induced plasma factor. Plasma specimens obtained from healthy adults 3 days after levamisole administration were further fractionated with stepwise ultrafiltration procedures and E-rosette-promoting activity in each filtrate was evaluated by incubating them with patient's lymphocytes for 6 h. Results were expressed as the means ± 1 S. D. of four to six separate experiments.

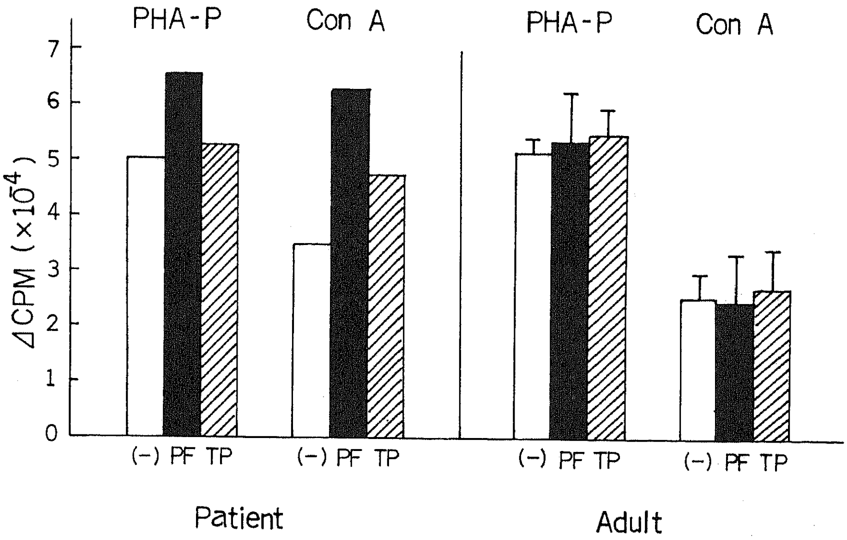

Fig. 6. Effect of plasma factor and thymopoietin on the mitogenic responses of lymphocytes. Lymphocytes obtained from the patient and five healthy adults were incubated with plasma factor or thymopoietin for 18h. After the incubation, lymphocytes were washed three times with RPMI media and cultivated with PHA-P or Con A for 3 days. ^{3}H-thymidine (1 μCi/ml) was added to each culture 24h before harvest and thymidine uptake was counted. Results were expressed as the difference between the means of triplicate mitogen-stimulated and control cultures (△cpm). (−): not treated; PF: plasma factor treated; TP: thymopoietin treated.

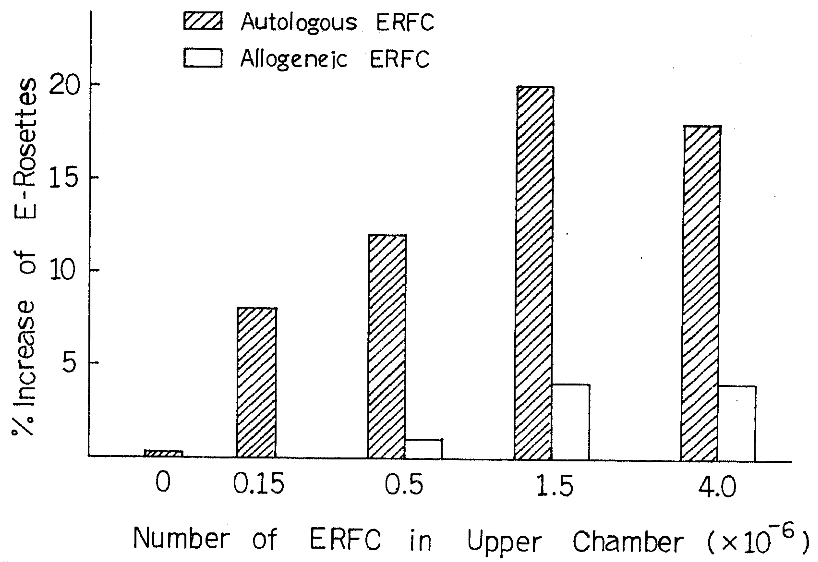

Fig. 7. E rosette-induction in patient's non-ERFC by plasma factor in co-operation with autologous mature Tcells. Lymphocytes were fractionated into ERFC and non-ERFC by E rosette formation followed Ficoll gradient sedimentation. Modified Boyden chamber separated by cell-impermeable membrne was used to cultivate patient's non-ERFC and autologous or allogeneic ERFC. These cells were cultivated with plasma factor for 15h. Then, patient's non-ERFC were washed twice with media and ERFC were enumerated.

考　　察

DiGeorge 症候は，胸腺の無形成または低形成に基づくT細胞不全の疾患であるが，1972年 Steel ら[22]が，millipore diffusion chamber 中に入れた胎児胸腺の移植による治療に成功してから，胸腺ホルモンの分泌低下が本症候の病態の中心であることが明らかになった．近年本症候の治療に胸腺ホルモンが使用されるようになったが，complete form と partial form では治療効果に差がみられることが知られるようになった．Wara ら[23]は，胸腺が完全に欠損し容易に GVH 反応を引き起こす complete form では thymosin などの胸腺ホルモンによる治療に反応せず，この型では prethymic cell が欠如しているためと推定している．一方胸腺の不完全欠損である partial DiGeorge 症候では，GVH 反応も起こり難く thymosin 治療によく反応し，in vitro でも thymosin によりEロゼット形成能が増強するのが確かめられている[23][24]．このように partial DiGeorge 症候では，残存する胸腺に影響を受けた postthymic precursor cell[25]が存在し，胸腺ホルモン投与により末梢で成熟T細胞へ分化すると考えられている．

今回の報告症例は，末梢血の ERFC が低値で thymic-hormone activity も著減しているが，in vitro での PBL の PHA 反応や MLC 反応は比較的保たれており，新鮮血輸血後も GVH 反応も起こさなかった．以上のことより本例は partial DiGeorge 症候と診断された．ここで生後1週の ERFC が 47％と正常域にあったのは，胎盤を通過した母親由来の胸腺ホルモンの影響があったためと考えられる[18]．LMS 投与3週後 ERFC は 16％から 51％に著明に増加し，中止後急激に低下した．また再投与後も同様な変化がみられた．LMS 投与後の PBL の mitogen に対する反応性は，ERFC の増加に一致してやや増強されたが，one-way MLC 反応や遅延型過敏皮膚反応では変化がみられなかった．さらに血漿中の thymic-hormone activity は，LMS 投与後正常値まで増加した。

本例でみられた LMS によるEロゼット形成能の増強を検討するため，in vitro で患児骨髄細胞や PBL を LMS で培養しても，ERFC の増加はみられなかった．このことにより in vivo での ERFC の増加は LMS の直接作用ではなく，血漿中に誘導される因子が関与していると考えられた．これまで動物実験により LMS の胸腺ホルモン様作用が確かめられているが，その作用機序として，Goldstein[26]は LMS の構造が polipeptide である TP の活性部位と類似しているためと述べている．しかし Aiuti ら[27]は，in vitro で DiGeorge 症候の PBL を LMS で培養しても ERFC は増加しないが，TP や thymopoietin pentapeptide では増加することを観察している．また LMS は imidazole 環を有しており，末梢血T細胞やマクロファージの細胞内の cyclic GMP を増加させその機能を高めると考えられているが，未熟T細胞の分化は cyclic AMP 依存の機能であり，さらに imidazole にはT細胞分化作用がないとされている[10]．以上のことからも LMS には直接T細胞を分化させる作用がないと考えられる．マウスを用いた実験でも，LMS 投与後の血清を他のマウスに注入すると免疫促進効果があることから，LMS は血清因子を介して作用すると報告されている[28]．

In vitro で，LMS 投与中止後の患児 PBL を用いて血漿因子のEロゼット形成増強能の活性を検討すると，LMS 投与後患児と健康成人の血漿には同程度の活性が認められた．この活性は LMS 投与後3日目に最高値に達したが，LMS やその代謝産物は 48 時間以内に体内より排泄されるので[1]，この血漿因子の活性はそれらによるものと考えられない．さらにこの血漿因子の性状を検討すると，耐熱性で分子量が約 5,000 から 10,000 の間の比較的低分子の物質であると推定された．これは TP の性状とも類似しており[21]，本因子の活性も 200 ng/ml 濃度の TP の活性に相当すると考えられる．

胸腺摘出術を受けた重症筋無力症では，LMS 投与による血漿因子の活性増強はみられないが，LMS 投与前の血漿中にはわずかながら活性が認められた．今回の実験では胸腺摘出後1年以上経過した症例の血漿を使用したが，Twomey ら[29]も胸腺摘出後 10 ケ月以上の重症筋無力症でも 70％に胸腺ホルモン活性が認められたと報告している．このように LMS による血漿因子誘導には，低形成であっても胸腺の存在が必要と考えられる．Olusi ら[30]は，栄養失調ラットに LMS を投与すると，胸腺の重量・細胞数・皮質の厚さ・Hassall 小体などが増加し，細胞性免疫能が回復することを観察しており，partial DiGeorge 症候でも残存する胸腺に LMS が直接作用し，胸腺ホルモン様活性を有する血漿因子を誘導すると考えられる．しかし，Renoux ら[7]は胸腺が欠如しているヌードマウスにおいて，LMS が血漿因子を介して脾のT前駆細胞を分化させると報告し，さらにこの血漿因子は胸腺ホルモンとは異なり，肝細胞やマクロファージより分泌されると推定している．今回の実験では，胸腺摘出例からは血漿因子が誘導されず，これらの血漿因子の同異は現在のところ不明である．

血漿因子の mitogen response に及ぼす影響をみると，血漿因子や TP は成人 PBL の反応性にはほとんど影響を与えないが，Eロゼット形成能誘導の場合により長時間培養することにより，血漿因子は患児 PBL の

Con A に対する反応性を著しく増強し，また，PHA に対する反応性も若干高めた．一方 TP は患児 PBL の Con A 反応を少し高めるが，PHA 反応は不変であった．このように血漿因子と TP には，mitogen response の増強作用の点で多少の差がみられた．Hensen ら[31]は，ヒト胸腺上皮細胞の培養上清の液性因子はヒト胸腺細胞の PHA 反応には影響を与えないが，Con A 反応を著明に増強することを示しており，今回の血漿因子の作用と類似している．また Stabo ら[32]は，マウスでは T リンパ球の θ 抗原量の多少により PHA や Con A 反応に差異がみられるとしており，今回観察された血漿因子と TP の mitogen response 増強作用の差も，これが誘導する T 細胞の subpopulation の差による可能性も考えられる．

血漿因子の E ロゼット形成能増強の作用機序を検討するため，患児の non-ERFC と血漿因子を反応させても ERFC は誘導されず，血漿因子が直接未熟 T 細胞に作用するのではないと考えられた．細胞非交通性の膜で ERFC と non-ERFC を分離し血漿因子存在下で培養すると，患児 T 細胞が上室にある時のみその細胞数に比例して下室の患児 non-ERFC 中の ERFC の増加がみられた．このことより未熟 T 細胞の分化には．血漿因子の刺激で成熟 T 細胞より分泌されると考えられる液性因子が必要と推察された．さらに両親や他人の成熟 T 細胞存在下では ERFC が誘導されないことより，この液性因子の作用発現には HLA の適合性が必要と推定される．Oosterom ら[33]は，マウスの未熟胸腺細胞の PHA 反応や Con A 反応の増強には，ヒト胸腺上皮細胞の培養上清と成熟 T 細胞の存在が必要だとしており，今回の成績と類似していると思われる．このように LMS により誘導される胸腺依存性血漿因子の target 細胞は成熟 T 細胞で，これより分泌される液性因子により末梢において未熟 T 細胞が分化すると推察される．

現在 TP や thymosin[34]などの胸腺因子は大量生産されておらず，臨床的に免疫不全症に使用することは困難である．今回の実験より LMS が E ロゼット形成能増強作用や mitogen response 増強作用を有する血漿因子を誘導することが明らかになり，LMS は胸腺ホルモンの分泌低下が病態の中心をなすような免疫不全の治療に試みるべき薬剤の一つと考えられる．その際には，低ガンマグロブリン血症[35]や顆粒球減少症[36]などの副作用には十分注意をしなければならない．

結　　論

免疫賦活作用及び胸腺ホルモン類似作用が注目されている LMS を partial DiGeorge 症候の乳児に投与すると，末梢血中の ERFC が著明に増加し，血漿中の thymic-hormone activity も正常値まで増強した，LMS 投与による患児 PBL の E ロゼット形成能の増強を検討し以下の結論を得た．

In vitro で患児の PBL や骨髄細胞を LMS と培養しても ERFC の増加はみられないが，LMS 投与後の患児や健康成人の血漿には，患児 PBL の E ロゼット形成能を増強する作用が認められた．この血漿因子は分子量が 5,000 から 10,000 の耐熱性の物質で，TP と性状が類似していると推定された．またこの因子は胸腺摘出術を受けた重症筋無力症では誘導されず，本因子誘導には痕跡的であろうと胸腺の存在が不可欠であると考えられた．

この血漿因子は，in vitro で患児 PBL の E ロゼット形成能を高めるばかりでなく，リンパ球の Con A に対する反応性も著しく増強した．さらに患児の non-ERFC を血漿因子と培養しても ERFC は増加しないが，患児の成熟 T 細胞と血漿因子が存在すると患児 non-ERFC の E ロゼット形成能が増強した．しかし，他人の成熟 T 細胞ではこのような増強はみられなかった．

以上より，本患児では LMS 投与後，残存する胸腺のもとで TP に類似した血漿因子が誘導され，この因子が末梢で成熟 T 細胞に作用し液性因子を分泌し，すでに末梢血に存在する E ロゼット形成能を持たない T 前駆細胞を成熟 T 細胞へ分化させると考えられる．

稿を終えるに臨み，御指導・御校閲下さいました恩師谷口昂教授に深く感謝いたします．また，多大な御協力を頂きました奥田則彦講師，宮脇利男先生，森谷直樹先生，長沖武先生はじめ小児科免疫グループの諸兄，並びに教室員の皆様に感謝いたします．最後に，TP を供与下さいました Dr.G.Goldstein，血漿の胸腺ホルモン活性を測定していただきました Dr. J. J. Twomey，重症筋無力症の血漿を提供していただいた本学第二内科竹田教授，小林先生並びに金沢医科大学広瀬先生，高堂先生に深謝いたします．

なお，本論文の要旨は，第 83 回日本小児科学会学術集会（1980）において発表した．

文　　献

1） **Symoens, J. & Rosenthal, M.**: A review. Levamisole in the modulation of immune response: The current experimental and clinical state. J. Reticuloendothel. Soc., 210, 175-221 (1977).

2） **Tripodi, D., Parks, L. C. & Brugmans, J.**: Drug-induced restoration of cutaneus delayed hypersensitivity in anergic patients with cancer. N. Engl. J. Med., 289, 354-357 (1973).

3) **Verhaegen, H., DeCree, J., DeCook, W. & Verbruggen, F.**: Levamisole and the immune response. N. Engl. J. Med., 289, 1148 - 1149 (1973).

4) **Ramot, B., Biniaminov, M., Schoham, Ch. & Rosenthal, E.**: Effect of levamisole on E - rosette - forming cells in vivo and in vitro in Hodgkin's disease. N. Engl. J. Med., 294, 809 - 811 (1976).

5) **Verhaegen, H., DeCree, J., DeCook, W. & Verbruggen, F.**: Restoration by levamisole of low E - rosette forming cells in patients suffering from various disease. Clin. Exp. Immunol., 27, 313 - 318 (1977).

6) **Van Ginckel, R. & Hoebeke, J.**: Effect of levamisole on spontaneous rosette - forming cells in murine spleen. Eur. J. Immunol., 6, 305 - 307 (1976).

7) **Renoux, G. & Renoux, M.**: Thymus - like activity of sulphur derivates on T - cell differentiatiation. J. Exp. Med., 145, 466 - 471 (1977).

8) **Van Wauwe, J. & Van Nijien, G.**: Effect of levamisole on autologus rosette - forming cells in nude mice. Clin. Exp. Immunol., 30, 465 - 468 (1977).

9) **Soppi, E., Fräki, J., Eskola, J. & Ruuskanen, O.**: Effect of levamisole on the maturation of guinea pig thymocytes. Clin. Immunol. Immunopathol., 11, 318 - 327 (1978).

10) **Symoens, J., Rosenthal, M., DeBrabander, M. & Goldstein, G.**: Immunoregulation with levamisole. Springer Semi. Immunopathol., 2, 49 - 68 (1979).

11) **DiGeorge, A. M.**: Discussion on a new concept of cellular base of immunology. J. Pediat.- 67, 907 - 908 (1965).

12) **Conley, M. E., Beckwith, J. B., Mancer, J. F. K. & Tenkhoff, L.**: The spectrum of the DiGeorge syndrome. J. Pediat., 94, 883 - 890 (1979).

13) **Lischner, H. W. & DiGeorge, A. M.**: Role of the thymus in humoral immunity: Observation in complete or partial congenital abscence of the thymus. Lancet, 2, 1044 - 1049 (1969).

14) **Pabst, H. F., Wrigh, W. C., LeRiche, J. & Stiehm, E. R.**: Partial DiGeorge syndrome with substantial cell - mediated immunity. Am. J. Dis. Child., 130, 316 - 319 (1976).

15) **Aiuti, F., Ammirati, P., Fiorilli, M., D'Amelio, R., Franchi, F., Clavani, M. & Businco, L.**: Immunologic and clinical investigation on a bovine thymic extract. Therapeutic applications in primary immunodeficiencies. Pediat. Res., 13, 797 - 802 (1979).

16) **Wara, D. W. & Ammann, A. J.**: Thmosin treatment of children with primary immunodeficiency diseane. Transplant. Proc., 10, 203 - 209 (1978).

17) **Barret, D. J., Wara, D. W., Ammann, A. J. & Cowan, M. J.**: Thymosin therapy in the DiGeorge syndrome. J. Pediat. 97, 66 - 71 (1980).

18) **Lewis, V., Twomey, J. J., Goldstein, G., Smithwick, E., Pahwa, S., O'Reilly, R., Pahwa, R., Good, R. A., Schulte - Wisserman, H., Hong, R., Jones, J., Sieber, O., Kirkpatrick, C., Polmar, S. & Bealmear, P.**: Circulating thymic - hormone activity in congenital immunodeficiency. Lancet, 2, 471 - 475 (1977).

19) **Weiner, M. S., Bianco, C. & Nussenzwing, V.**: Enhanced binding of neurarinidase - treated sheep erythrocytes to human T lymphocytes. Blood, 42, 939 - 946 (1973).

20) **Papamichail, M., Brown, J. C. & Halborow, E. J.**: Immunoglobulins on the surface of human lymphocytes. Lancet, 2, 850 - 853 (1971).

21) **Goldstein, G.**: The isolation of thymopoietin (thymin). Ann. N. Y. Acad. Sci., 249, 177 - 185 (1975).

22) **Steel, R. W., Limas, C., Thurman, G. B., Schulein, M., Bauer, H. & Bellanti, J. A.**: Attempted reconstitution with fetal thymus in a millipor diffusion chamber. N. Engl. J. Med., 287, 787 - 791 (1972).

23) **Wara, D. W., Goldstein, A. L., Doyle, N. E. & Ammann, A. J.**: Thymosin activity in patients with cellural immunodeficiency. N. Engl. J. Med., 292, 70 - 74 (1975).

24) **Touraine, J. L., Touraine, F., Dutruge, J., Gilly. J., Colon, S. & Gilly, R.**: Immunodeficiency disease. I. T - lymphocyte precursors and T - lymphocyte differention in partial DiGeorge syndrome. Clin. Exp. Immunol., 21, 39 - 46 (1975).

25) **Stutman, O.**: Humoral thymic factors influencing postthymic cells. Ann. N. Y. Acad. Sci., 249, 89 - 105 (1975).

26) **Goldstein, G.**: Mode of action of levamisole. J. Rheumatol. 5(Suppl. 4), 143 - 148 (1978).

27) **Aiuti, F., Businco, L., Rossi, P. & Quinti, I.**:

Resposnse to thymopoietin pentapeptide in patient with DiGeorge syndrome. Lancet, 1, 91 (1980.

28) **Van Ginckel, R. F. & Hoebeke, J.**: Carbon clearance enhancing factor in serum from levamisole treated mice. J. Reticuloendothel. Soc., 17, 65 - 72 (1976).

29) **Twomey, J. J., Lewis, V. M., Patten, B. M., Goldstein, G. & Good, R. A.**: Myasthenia gravis, thymectomy and serum thymic hormone activity. Am. J. Med., 66, 639 - 643 (1979).

30) **Olusi, S. O., Jessop. W. J. E. & Shoroye, A.**: Effect of levamisole on the immune responses of experimentally malnourished rats. Pediat. Res., 13, 1237 - 1239 (1979).

31) **Hensen, E. J., Hoefsmit. E. C. M. & Van Den Tweel, J. G.**: Augmentation of mitogen responsiveness in human lymphocytes by a humoral factor obtained from thymic epithelial cultures. Clin. Exp. Immunol., 32, 309 - 317 (1978).

32) **Stabo, J. D. & Paul, W. E.**: Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. III. Differential responsiveness of T cells to phytohemagglutinin and concanavalin A as a probe for T cell subsets. J. Immunol., 110, 362 - 375 (1973).

33) **Oosterom, R. & Kater, L.**: Target cell subpopulations for human thymic epithelial conditioned medium in the mouse thymus. Clin. Immunal. Immunopathol., 17, 183 - 195 (1980).

34) **Goldstein, A. L., Guha, A., Zatz, M. M., Hardy, M. A. & White, A.**: Purification and biological activity of thymosin, a hormone of the thymus gland. Proc. Nat. Acad. Sci (USA)., 69, 1800 - 1803 (1972).

35) **Berghs, H., Ceuppens, J., Stevens, E., Bloemmen, J. & Remans, J.**: Hypogammaglobulinemia during levamisole treatyent. Case report. Ann. Allergy, 41, 342 - 344 (1978).

36) **Williams, I. A.**: Levamisole and agranulocytosis. Lancet, 1, 1080 - 1081 (1976).

Induction of E-Rosette-Promoting Factor in Human Plasma by Levamisole Hidetoshi Seki, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **90**, 797–808 (1981)

Key words: Partial DiGeorge syndrome, Levamisole, E-rosette-promoting factor, Thymic hormone.

Abstract

Although the mode of levamisole is still unknown, a growing body of evidence suggests that levamisole might stimulate precursor T-lymphocytes to differentiate into mature T-lymphocytes. In this study, a male infant with partial DiGeorge syndrome, which is mainly associated with deficient secretion of thymic humoral factors, was treated with levamisole. Following weekly administration of levamisole (2.5 mg/kg of body weigh), E-rosette-forming T cells in the patient's lymphocytes increased from 16% ot 51% within 3 weeks of treatment. Thymic hormone activity in plasma also appeared to be elevated to a normal level of 11.6 ng thymopoietin equivalent/ml after levamisole administration.

In vitro incubation studies indicated that levamisole by itself had no E-rosette-promoting ability, but a dialyzable and relative heat-stable plasma factor induced by levamisole in the patient as well as in healthy individuals had E-rosette-promoting activity for the patient's lymphocytes. Such a plasma factor, however, could not be induced in all four thymectomized myasthenic subjects examined, suggesting the thymus-dependent nature of the plasma factor. These results suggested that levamisole might mediate an increased secretion of plasma factor(s) with E-rosette-promoting activity, even from such a rudimentary thymus as in the partial DiGeorge syndrome.

The levamisole-inducible plasma factor also enhanced the patient's lymphocyte responsiveness to Con A and PHA. Although *in vitro* incubation of the patient's non-ERFC with plasma factor showed no appreciable E-rosette-promoting effect, incubation study using modified Boyden chamber separated by cell-impermeable membrane indicated that plasma factor induced ERFC in the patient's non-ERFC in co-operation with only autologous mature T cells. Allogeneic mature T cells could induce no E-rosette-promoting activity in the patient's non-ERFC. These results suggested that the levamisole-inducible plasma factor might induce the HLA compatibility-depending humoral factor from mature T cells and induce E-rosette-promoting activity in the patient's immature T cells.