

慢性肝炎患者末梢血におけるT細胞サブセットとヘルパー, サプレッサー機能について

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/2297/8830

慢性肝炎患者末梢血におけるT細胞サブセットとヘルパー、サプレッサー機能について

金沢大学医学部病理学第二講座 (主任: 太田五六教授)

谷 野 幹 夫

(昭和55年3月21日受付)

本論文の要旨は第14回日本肝臓学会西部会(鹿児島)で発表した。

ヒトリンパ球のT細胞において、Fcリセプターを基にしてわけられたT細胞サブセットと、機能面よりみたヘルパー、サプレッサー、アンプリファイヤー、キラー細胞などとの関連性の問題や、各種疾患におけるそれらの関係の解析が進められつつある。肝疾患においても、T細胞サブセットを検索した報告は最近いくつかみられるようになったが、その成績はまだ一致していない¹⁾⁻⁵⁾。また、ヘルパー、サプレッサー機能を検索した本格的な報告は殆んどない。少数の予報的な報告によると、慢性肝炎ではヘルパー機能が上昇するか、あるいはサプレッサー機能が低下するとされ⁶⁾、ことに慢性活動性肝炎では、concanavalin A (Con A)で誘導されるサプレッサー活性が明らかに低下しているという^{7,8)}。しかし、慢性肝炎におけるT細胞サブセットと、ヘルパー、サプレッサー機能との関連について検討した報告は全くない。

今回、筆者は慢性肝炎におけるT細胞の数的、機能的異常の一端を知る目的で、患者末梢血リンパ球のT細胞 population, IgG-Fcリセプター陽性T細胞 (T_γ) population, IgM-Fcリセプター陽性T細胞 (T_μ) populationを測定し、さらにT細胞分画、X線照射T細胞分画、T_γ細胞分画のサプレッサー活性あるいはヘルパー活性をさまざまな工夫を施した反応系を用いて測定し、またCon A誘導法によるサプレッサー活性も併せて検索したので報告する。

対象と方法

I. 対象

血清生化学的検査ならびに肝生検で診断しえた慢性活動性肝炎 (CAH) 52例、慢性非活動性肝炎 (CIH)

39例と健常者27例を対象とした。

II. 方法

1. リンパ球の分離

1). 末梢血からの全リンパ球の分離

全リンパ球の分離はBöyumの比重遠心法⁹⁾に準じて行なった。健常者および患者よりヘパリン加末梢血を採取し、pH 7.4 phosphate buffer solution (PBS) で2倍希釈後、Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemical, Sweden) に重層し、400G 30分間遠心した。中間白濁層を採取し、PBSにて洗浄、全リンパ球とした。

2). 全リンパ球からのT, B細胞分離

矢田¹⁰⁾の方法に準じ、非働化した牛胎児血清 (FCS: Microbiological Associate, USA) 中に $5 \times 10^6/ml$ に浮遊した全リンパ球と $2 \times 10^8/ml$ に FCS 中に浮遊した AET (Wako, Japan) 処理ヒツジ赤血球¹¹⁾ とを等量混和、200G で5分間遠心し、氷水中に1時間以上静置した後、細胞を静かに再浮遊させ、再び Ficoll-Hypaque に重層し、400G で30分間遠心した。まず、中間層の細胞を採取し、PBSで洗浄後、10%のFCSを含むRPMI1640培養液 (Nissui, Japan, 1ml中に penicillin G100単位, streptomycin 100 μ gを含む) に浮遊した。一方、管底に遠心沈澱した細胞ペレットに NH_4Cl 液 (0.83% NH_4Cl 容に pH 7.4 Tris buffer 1容を加えたもの) を適量加え、溶血させ、PBSで洗浄後、同様に培養液に浮遊した。前者はB細胞を主としているので、B rich細胞分画とし、後者をT細胞分画とした。(B細胞の混入は1%以下であった。)

3) T細胞分画へのX線照射

T Cell Subsets and Helper and Suppressor Functions in the Peripheral Blood from Patients with Chronic Hepatitis. Mikio Tanino, Department of Pathology (II), School of Medicine, Kanazawa University.

2) で分離した T 細胞分画に対し, X 線照射装置 (Toshiba, Japan) を用い, 50Rad./min. で 40 分間, 計 2000Rad. の X 線を照射した.

4). T γ 細胞分画の分離

ヒツジ赤血球をウサギに免疫し作った抗血清を DE AE セルロースおよびセファデックス G200 カラムトグラフィーにかけ, IgG 分画をえた. Parish ら¹²⁾の方法に準じてその分画での凝集価を測り, 2 倍希釈液でヒツジ赤血球を感作して, この IgG 抗体感作ヒツジ赤血球を 2×10^6 /ml に PBS 中に浮遊し, 5×10^6 /ml に PBS 中に浮遊した T 細胞とを等量混和, 水平回転振盪器にて 30 回転/分で 37 $^{\circ}$ C, 15 分接触させ, Ficoll-Hypaque にて比重遠心し, 管底部の細胞ペレットを T γ 細胞として回収し, NH $_4$ Cl 液で溶血させ, 採取, 培養液に浮遊した.

2. T 細胞 population の測定

橋ら¹³⁾の微量測定法に従い, AET 処理をしたヒツジ赤血球と全リンパ球とを 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させ, 3 個以上のヒツジ赤血球とロゼットを形成するリンパ球を T 細胞とし, その全リンパ球中に占める比率を算定し, 全リンパ球への単球混入による誤差を, ペルオキシンダーゼ陽性細胞率で補正した.

3. T γ 細胞および T μ 細胞 population の測定

T γ の population は, 新保ら¹⁴⁾の方法に準じ, T μ は著者の変法により, 次のようなダブルロゼット法で測定した. ウサギ抗ニワトリ赤血球 IgG あるいは IgM 抗体で感作したニワトリ赤血球 (CkEA γ , CkEA μ) と全リンパ球とを等量 PBS 中に浮遊, 氷水中に 24 時間静置, 反応させた後, 上清をすて, FCS 中に浮遊した AET 処理ヒツジ赤血球を加え, 静かに混和した. 200G で 5 分間遠心し, 再び氷水中に 24 時間静置後, 再浮遊させ, ロゼット形成細胞を算定した. ヒツジ赤血球 3 個以上, CkEA γ あるいは CkEA μ 2 個以上とが同時にロゼットを形成するリンパ球を, それぞれ T γ 細胞, T μ 細胞とし, その T 細胞 (ヒツジ赤血球 3 個以上とロゼットを形成する細胞) 中に占める比率で, T γ 細胞, T μ 細胞の population を表現した.

4. 患者 T 細胞分画の Ig 産生細胞への分化に及ぼす影響

1) T 細胞分画の Ig 産生細胞分化への促進あるいは阻止活性

同一健常者の B rich 細胞をレスポンダーとして, その 20 万個単独のもの, 健常者あるいは肝炎患者の T 細胞を 80 万個加えたもの, 10 μ g/ml の PWM (Grand Island Biological Company, USA) を添加した. これを 1 ml の培養液に浮遊し, 1 週間培養後, 死細胞も含めて細胞数を算定したのち, 遠心して細胞を

集め, 無蛍光スライドガラス上に塗抹乾燥してから, アセトンにて 10 分間固定後, 蛍光標識抗ヒト免疫グロブリン抗体 (Hoechst, West Germany) をマウントして染色し, 蛍光顕微鏡下に immunoglobulin (Ig) 産生細胞数を算定した. 下記の算定式により, 肝炎患者 T 細胞分画の Ig 産生細胞分化への促進あるいは阻止活性を表現した.

T 細胞分画の促進あるいは阻止活性 =

$$\frac{(B + \text{患者}T) \text{ からの Ig 細胞数} - B \text{ のみからの Ig 細胞数}}{(B + \text{健常者}T) \text{ からの Ig 細胞数} - B \text{ のみからの Ig 細胞数}} \times 100$$

2) T 細胞分画への X 線照射による Ig 産生細胞分化への影響 (T 分画 X 線照射によるヘルパー活性)

4 の 1) の実験系での T 細胞分画中にはヘルパー T 細胞と共に, サプレッサー T 細胞も含まれており, それらの活性を総和したものを健常者と比較して促進あるいは阻止活性をみている. そこで, 1 の 3) の方法で示されている, サプレッサー T 細胞を選択的に不活化するとされる X 線¹⁵⁾を 2000Rad. T 分画に照射した後, 4 の 1) におけると同様の方法および算定式で Ig 産生細胞分化へのヘルパー活性を観察した.

3) T 細胞の B 細胞に対する比率を増加させて両者混合培養した時の Ig 産生細胞分化への影響

同一健常者の B rich 細胞 20 万個に, 健常者あるいは患者から分離した T 分画の細胞をそれぞれ 20, 80, 160 万個 (T/B 比はそれぞれ 1, 4, 8) と増加させて加え, 10 μ g/ml の PWM を添加した 1 ml の培養液中に 1 週間培養し, 4 の 1) と同様の方法を用いて Ig 産生細胞数を算定し, T/B 細胞比漸増による影響をみた. この方法は, 健常者, および肝炎患者の末処理 T 細胞分画の有するヘルパーあるいはサプレッサー活性を増幅観察するためのものである.

4) X 線照射した T 分画細胞の B 細胞に対する比率を増加させて両者混合培養した時の Ig 産生細胞分化への影響

T 細胞分画に 2000Rad. の X 線照射を施した後, 前項と同様の実験を行ない, 健常者および肝炎患者のヘルパー T 細胞の活性を検討した.

5) T γ 細胞分画を分離し, B 細胞に対する比率を増加させて両者混合培養した時の Ig 産生細胞分化への影響

T γ 細胞は *in vitro* での B 細胞の Ig 産生を抑制する (サプレッサー T 細胞として機能する) とされる¹⁶⁾. そこで, 1 の 4) の方法で分離した T γ 細胞分画を用い, 同様に T γ /B 細胞比を 1, 4, 8 と漸増させて培養し, T γ 細胞のサプレッサー活性の発現の有無, 健常者および

び肝炎患者におけるその相違について検討した。

5. T細胞分画を Con A で刺激し、健常者 B細胞分画に PWM を加えて混合培養した時の、Ig 産生細胞分化に対するサブプレッサー活性

Kuritani ら¹⁷⁾に準じて、まず健常者あるいは患者の T細胞を、一方では $10\mu\text{g/ml}$ の Con A (Sigma, USA) を添加した培養液に、他方では Con A を添加しない培養液に浮遊し、48 時間培養後、それぞれをサブプレッサー T細胞、コントロール T細胞とした。次に細胞膜に付着している Con A 除去のため、両者共、 0.1M の α -methyl-mannoside (P-L Biochemicals Inc., USA) を含む培養液中に 30 分間培養、洗浄後、それぞれの T細胞 20 万個を、新たに得た同一健常者の B rich 細胞 20 万個に加え、 $10\mu\text{g/ml}$ の PWM を添加した培養液中に 1 週間培養後、4 の 1) の矢田¹⁰⁾と同様の方法で Ig 産生細胞数を算定し、以下の式でサブプレッサー活性を表現した。

サブプレッサー活性 =

$$\left[1 - \frac{(B + \text{サブプレッサー T}) \text{からの Ig 細胞数}}{(B + \text{コントロール T}) \text{からの Ig 細胞数}} \right] \times 100$$

6. 全リンパ球を Con A で刺激し、健常者全リンパ球に Con A を加えて混合培養した時のリンパ球幼若化反応に対するサブプレッサー活性

Shou ら¹⁸⁾の方法に準じ、全リンパ球を 48 時間 $10\mu\text{g/ml}$ の Con A で処理したもの、しないものをそれぞれサブプレッサー細胞、コントロール細胞とし、両者共、 $50\mu\text{g/ml}$ の Mitomycin C (Sigma, USA) で処理し、DNA 合成を阻止した。さらに両者を 30mM の α -methyl-mannoside を含む培養液で 3 回洗浄してから、 $1 \times 10^6/\text{ml}$ に培養液に浮遊した。新たに浮出した同一健常者の全リンパ球をレスポンド細胞として $1 \times 10^6/\text{ml}$ に培養液に浮遊し、その 1ml に、上記のサブプレッサーあるいはコントロール細胞 1ml を加えて、再び $10\mu\text{g/ml}$ の Con A を添加して 72 時間培養、収穫した。収穫の 24 時間前に各々に $2\mu\text{Ci}$ の ^3H -thymidine (HdR: The Radiochemical Centre, England) を加え、レスポンド細胞への HdR の取り込みを測定し、以下の算定式によりサブプレッサー活性を表現した。

サブプレッサー活性 =

$$\left[1 - \frac{(\text{レスポンド細胞} + \text{サブプレッサー細胞}) \text{での HdR の取り込み (cpm)}}{(\text{レスポンド細胞} + \text{コントロール細胞}) \text{での HdR の取り込み (cpm)}} \right] \times 100$$

成 績

1. T細胞 population

T細胞 population は健常者が $79.4 \pm 7.0\%$ ($n = 12$) であるのに対し、CAH $60.2 \pm 14.5\%$ ($n = 18$)、CIH $59.5 \pm 8.1\%$ ($n = 14$) と、慢性肝炎では有意の減少 ($p < 0.01$) を認めた。(Fig. 1)

2. T γ 細胞および T μ 細胞の population

T γ 細胞の T細胞中に占める%は健常者の $7.8 \pm 4.9\%$ ($n = 27$) に対し、CAH の $14.5 \pm 3.8\%$ ($n = 19$)、CIH の $15.4 \pm 4.5\%$ ($n = 15$) と、慢性肝炎では有意の増加 ($p < 0.01$) を認めた。T μ 細胞の%は健常者が $17.7 \pm 6.7\%$ ($n = 16$) であるのに対し、CAH $21.8 \pm 5.5\%$ ($n = 19$) と増加傾向 ($p < 0.1$) を、CIH $13.5 \pm 4.5\%$ ($n = 15$) と減少傾向 ($p < 0.1$) を認めた。(Fig. 2)

3. 患者 T細胞分画の Ig 産生細胞への分化に及ぼす影響

方法 4 の 1) に示したように、患者 T細胞を同一健常者の B rich 細胞とともに培養し、PWM 添加のもとで Ig 産生細胞数を算定し、健常者 T細胞を用いた時の数と比較して、活性を表示した。結果 (Fig. 3) は、健常者コントロールを 100 とすると、CAH では $148.4 \pm 45.8\%$ ($n = 30$) と活性上昇を示すのに対し ($p <$

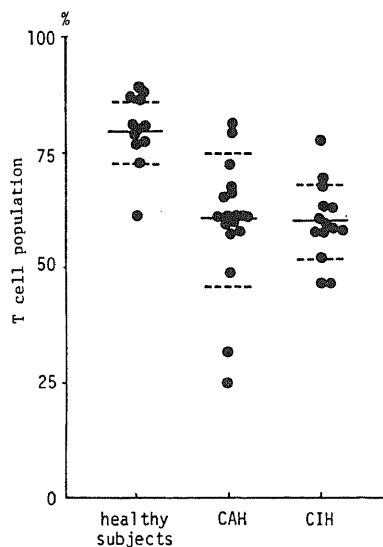


Fig. 1. T cell population in patients with chronic hepatitis and healthy subjects.

CAH: chronic active hepatitis

CIH: chronic inactive hepatitis

0.01), CIHでは $99.0 \pm 47.3\%$ ($n = 24$)と、健常者と有意差なかった。100 ± 20%をコントロール活性の範囲内と考えると、CAHでは22例(73.3%)がコントロール活性を上回り、3例(10.0%)が下回るにすぎなかったのに対し、CIHでは3例(12.5%)がコントロール活性を上回ったにすぎず、逆に10例(41.7%)が下回った。

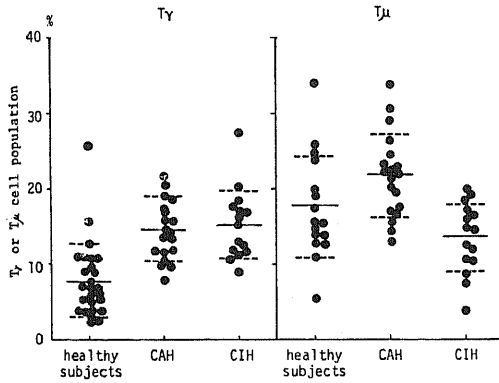


Fig. 2. T_γ and T_μ cell population in patients with chronic hepatitis and healthy subjects.

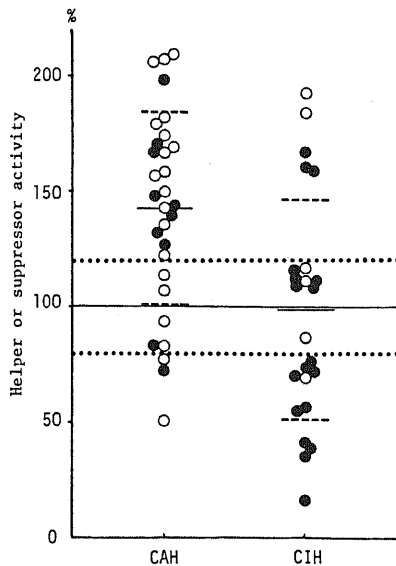


Fig. 3. Helper or suppressor activity in patients with chronic hepatitis. Values between two dotted lines represent control range.

○: HBsAg positive
●: HBsAg negative

4. T細胞分画へのX線照射によるIg産生細胞分化への影響(T分画X線照射によるヘルパー活性)

予め健常者および患者T細胞分画にX線を照射して、サプレッサー活性を完全に阻止し、ヘルパー活性のみとしたT細胞分画を、B rich細胞と培養すると、CAHでは $109.5 \pm 22.8\%$ ($n = 10$)のIg産生細胞分化能を示し、CIHでは $95.1 \pm 19.6\%$ ($n = 10$)であり、共に健常者(100%)との間に有意差がなかった。(Fig. 4)

5. T細胞のB細胞に対する比率を増加させて両者混合培養した時のIg産生細胞分化への影響

方法4の3)に示したように、健常者あるいは患者T細胞分画と同一健常者B rich細胞分画の混合培養比を漸増してPWM存在下で培養し、Ig産生細胞数を算定し、T細胞分画のヘルパーまたはサプレッサー活性を増幅して直接観察せんとしたものである。結果(Fig. 5)として、Ig産生細胞数($\times 10^3$)は、T/B細胞比1, 4, 8とした場合、健常者ではそれぞれ、 24.1 ± 5.8 , 21.9 ± 7.9 , 20.6 ± 8.1 , CAHでは 31.2 ± 6.3 , 29.4 ± 7.7 , 27.1 ± 8.5 , CIHでは 22.8 ± 7.4 , 21.2 ± 6.7 , 19.9 ± 6.3 (3群共 $n = 11$)であり、CAHでは健常者に比し、いずれのT/B細胞比でも有意にIg

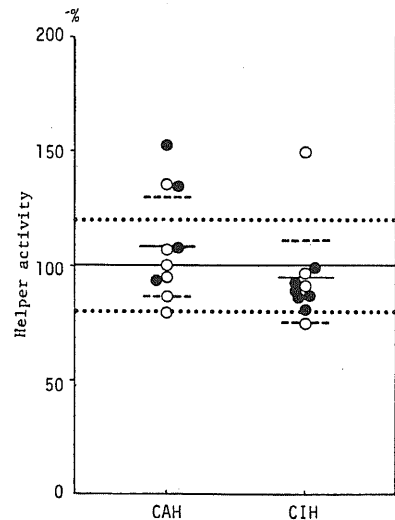


Fig. 4. Helper activity using X-ray irradiated T cell fraction in patients with chronic hepatitis. Values between two dotted lines represent control range.

○: HBsAg positive
●: HBsAg negative

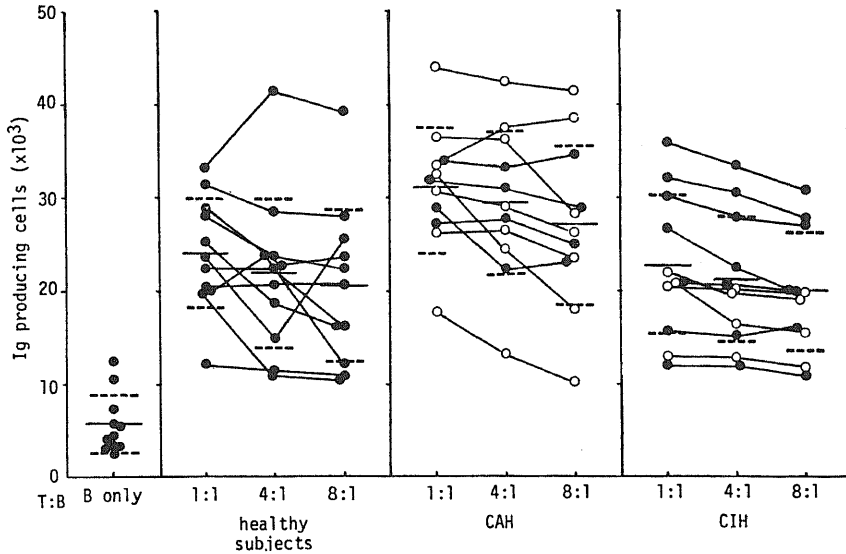


Fig. 5. Changes of Ig producing cell counts on 7 day incubation of B cell with increasing numbers of non-treated T cell.

○: HBsAg positive
●: HBsAg negative

産生細胞数が増加しているものの ($p < 0.01$), 3 群共, 各群内では T/B 細胞比を漸増して培養しても, 有意な Ig 産生細胞数の増減がなかった。

6. X 線照射した T 分画細胞の B 細胞に対する比率を増加させて両者混合培養した時の Ig 産生細胞分化への影響

方法 4 の 4) に示したように, サプレッサー活性を阻止し, ヘルパー活性のみとした T 細胞分画の活性が, T/B 細胞比の漸増に伴ない増強されるか否かをみたものである。結果 (Fig. 6) として, Ig 産生細胞数 ($\times 10^3$) は, T/B 細胞比 1, 4, 8 の場合, 健常者ではそれぞれ, 47.2 ± 17.5 , 91.2 ± 26.6 , 112.1 ± 29.5 , CAH では 52.8 ± 17.0 , 98.6 ± 30.1 , 121.8 ± 36.1 , CIH では 49.6 ± 15.1 , 85.7 ± 25.1 , 101.2 ± 33.6 (3 群共 $n = 10$) と, いずれの群でも T/B 細胞比の漸増に伴ない, \times 直線的に Ig 産生細胞数が増加した。しかし, 3 群間には有意差はなかった。

7. $T\gamma$ 細胞分画を分離し, B 細胞に対する比率を増加させて両者混合培養した時の Ig 産生細胞分化への影響

方法 4 の 5) に示したように, サプレッサー T 細胞として機能するとされる $T\gamma$ 細胞を分離し, $T\gamma/B$ 細胞比を漸増して混合培養した時の, サプレッサー活性の増強の有無, および健常者と患者におけるその相違を

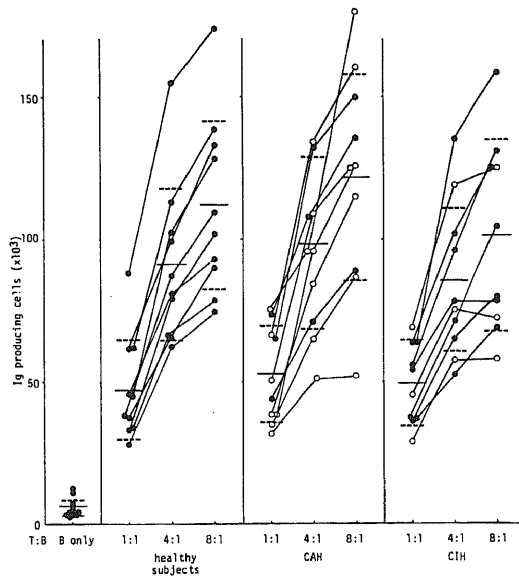


Fig. 6. Changes of Ig producing cell counts on 7 day incubation of B cell with increasing numbers of X-ray irradiated T cell.

○: HBsAg positive
●: HBsAg negative

みたものである。結果 (Fig. 7) として, Ig 産生細胞数 ($\times 10^3$) は, $T\gamma/B$ 細胞比 0 (B 単独), 1, 4, 8 の場合, 健常者ではそれぞれ, 6.3 ± 1.8 , 5.9 ± 0.7 , 4.8 ± 1.1 , 5.0 ± 1.2 ($n = 5$), CAH では $7.1 \pm$

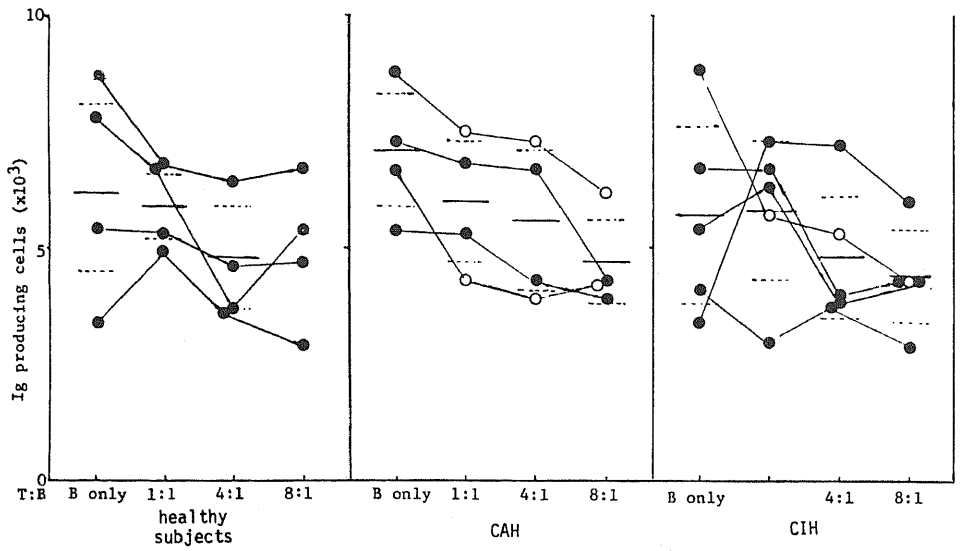


Fig. 7. Changes of Ig producing cell counts on 7 day incubation of B cell with increasing numbers of T_γ cell.
 ○: HBsAg positive
 ●: HBsAg negative

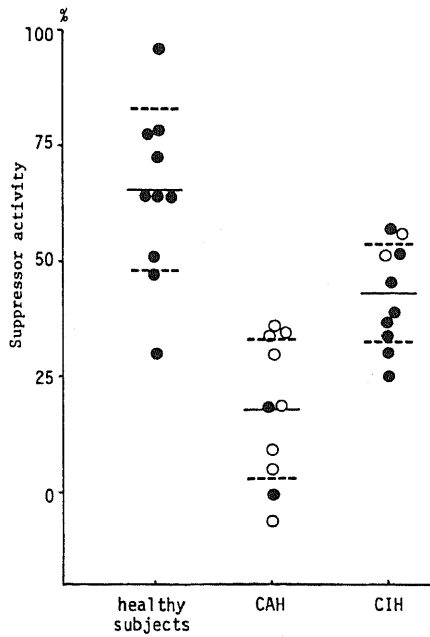


Fig. 8. Con A-induced suppressor activity of T cell fractions in a test system of PWM-induced Ig production in patients with chronic hepatitis and healthy subjects.
 ○: HBsAg positive
 ●: HBsAg negative

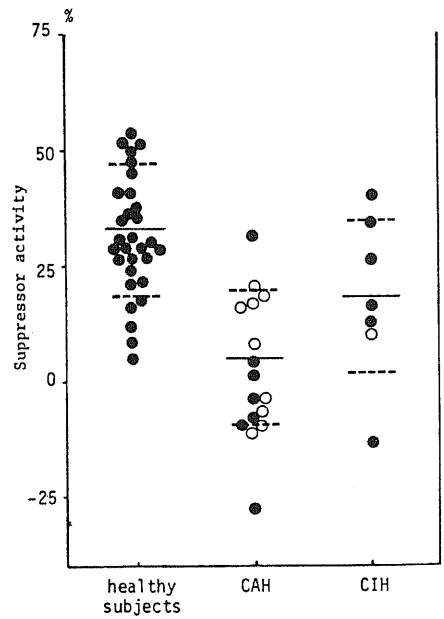


Fig. 9. Con A-induced suppressor activity of T cell fractions expressed by Con A-induced blastogenesis of certain whole lymphocyte in patients with chronic hepatitis and healthy subjects.

1.2, 6.0 ± 1.3 , 5.6 ± 1.5 , 4.7 ± 0.9 ($n = 4$) , CIH では 5.7 ± 1.9 , 5.8 ± 1.5 , 4.8 ± 1.3 , 4.4 ± 1.0 ($n = 5$) であり, T γ 細胞の代りに T 細胞を用いた場合 (Fig. 5) に比較して Ig 産生細胞数は減少した ($p < 0.001$). 3 群共に, T γ /B 細胞比を漸増していくにつれ, Ig 産生細胞数は漸減していく傾向があると思われたが, 症例数が少ないため推計学的有意差検定ができなかった. また, それぞれの T γ /B 細胞比で, 3 群間に有意差はなかった.

8. T 細胞分画を Con A で刺激し, 健常者 B 細胞分画に PWM を加えて培養したときの, Ig 産生細胞分化に対するサプレッサー活性 (Con A 誘導による B 細胞の Ig 産生細胞分化に対するサプレッサー活性)

健常者の Con A 誘導によるサプレッサー活性は $65.5 \pm 17.7\%$ ($n = 10$) であるのに対し, CAH では $17.9 \pm 15.1\%$ ($n = 10$) と著明なサプレッサー活性の低下があり ($p < 0.001$), CIH では $43.1 \pm 10.7\%$ ($n = 10$) と軽い低下をみた ($p < 0.01$). (Fig. 8)

9. 全リンパ球を Con A で刺激し, 健常者全リンパ球に Con A を加えて混合培養したときのリンパ球幼若化反応に対するサプレッサー活性 (Con A 誘導によるリンパ球幼若化に対するサプレッサー活性)

健常者のサプレッサー活性は $32.9 \pm 14.3\%$ ($n = 31$) であるのに対し, CAH では $4.7 \pm 14.3\%$ ($n = 16$) と著明なサプレッサー活性の低下があり ($p < 0.001$), CIH では 18.0 ± 16.5 ($n = 7$) と軽い低下をみた ($p < 0.01$). (Fig. 9)

考 察

Eddleston ら¹⁹⁾は, HBsAg 陰性の CAH の肝内で起る肝細胞崩壊のメカニズムとして, サプレッサー T 細胞機能の低下が重要であるとし, そのため肝細胞膜抗体の発生を阻止できなくなって, 補体の関与する液性免疫や細胞障害性を有するリンパ球と膜抗体との関与する細胞性免疫 (ADCC) の結果, 持続的肝細胞崩壊が起るだろうと考えた.

最近, T 細胞サブセットとその機能に関する研究がとみに進展し, なかでもサプレッサー能を持つ細胞を *in vitro* で測定可能となった. 即, Moretta ら²⁰⁾²¹⁾は, T 細胞表面膜が IgG または IgM の Fc 部分に対するリセプターを有するものをそれぞれ T γ 細胞, T μ 細胞と名づけ, 他方, B 細胞が抗体産生細胞に分化する過程において, T 細胞が協動的にも, また逆に抑制的にも

関与し, これら 2 種類の相反する作用は, それぞれ種類の異なるヘルパー T 細胞, サプレッサー T 細胞によって行なわれることが明らかとなり²²⁾, Moretta ら¹⁹⁾は, T γ 細胞はサプレッサー機能, T μ 細胞はヘルパー機能を有しているとした. そして少数例であるが, CAH, 皮膚筋炎, SLE などの患者末梢血の T γ 細胞および T μ 細胞 population を測定し, 異常を認めた症例を発表している²³⁾.

肝炎患者における T 細胞サブセットに関する報告は最近になり, 2, 3 みられるようになった. 菅ら¹⁾は, 慢性肝炎においては T γ 細胞 population が増加し, 逆に T μ 細胞は減少するとし, これを Moretta らの説と関連させ, 慢性肝炎にみられる細胞性免疫機能の低下を, サプレッサー機能をもつ T γ 細胞の増加, ヘルパー機能をもつ T μ 細胞の減少という二つの因子の相乗的組み合わせによるであろうと推定している. 今回の筆者の検索では, 慢性肝炎において, T γ 細胞は菅らと同様に増加を示したが, T μ は CAH では増加傾向を, CIH では減少傾向を認め, 菅らとはやや相違していた. 他の報告例でも, 慢性肝炎では T γ 細胞, T μ 細胞共に減少するとするもの⁵⁾や, CAH では T γ 細胞が減少するとするもの³⁾など, その成績は一致していない. しかし T γ 細胞や T μ 細胞の population の増減が, *in vitro* でのサプレッサー機能やヘルパー機能の増減を意味するものではないことは, 本実験の結果からも明らかであり, これらの機能は機能として *in vitro* で実験する必要がある.

そこで分離した患者 T 細胞分画が一定の健常者 B rich 細胞分画を PWM 存在下で刺激して, その混合培地で Ig 産生細胞分化を促進あるいは阻止するかどうかをみたところ, 73.3% の CAH 患者では, その T 細胞分画が健常者のそれに比べて, 明らかに Ig 産生細胞数の増加をもたらした. つまり Ig 産生を PWM 存在下でヘルプすることがわかった. これに反し, CIH ではわずか 12.5% の患者にこれを見るだけであった. このようなヘルパー作用は, 患者 T 細胞分画中のヘルパー能の増強によっても, またサプレッサー能の低下によっても生ずるので, そのいずれであるかを知る目的で, 患者 T 細胞に予め X 線を照射して, サプレッサー能を完全に阻止し, ヘルパー能のみの状態として, 同様の B rich 細胞分画と共に PWM 存在下で培養した. その結果, 健常者, CAH, CIH のいずれもヘルパー能には全く相違がないことを知ったので, CAH の T 細胞分画では, サプレッサー能の低下があり, そのため上記の見かけ上のヘルパー能優位の所見が生じたものと判断した.

矢田ら⁹⁾は、予報的観察として、慢性肝炎患者のT細胞分画のサプレッサー能が低下しているであろうと述べ、本実験成績と同一の傾向を記載しているが、詳細なデータの記載がなく、また慢性肝炎について本実験の如き方法を用いた英文報告がないので、本報告が最初の追求であろうと考えている。

そこで、T細胞対B細胞の比を増加させて培養し、PWMの存在下でIg産生細胞数の増加(サプレッサー能の低下の増幅)が起るかどうかを観察した。しかしT/B細胞比を1, 4, 8としても健常者, CAH, CIHともにそのような増幅現象はみられず、したがってサプレッサー能の低下しているCAHのT細胞分画中では、ヘルパー能と拮抗してB rich細胞に反応しているものと判断せざるをえなかった。しかしPWMは培地中でT細胞分画をも刺激するので、サプレッサー能も軽く刺激されて増幅現象が打ち消されている可能性もある。しかしT/B細胞比増加の1つ1つの成績を3者で比較すると、CAHのT細胞分画は常に健常者に比べてIg産生細胞分化を促進しており、サプレッサー能の低下がこの実験でも示された。さらにT細胞分画に予めX線を照射し、サプレッサー能を阻止して上記と同一のT/B細胞比増加培養実験を試みたところ、ほぼ直線的にIg産生細胞数が増加することがわかったので、T細胞分画中での陰陽相反する作用の拮抗論が支持されたと考える。さらに次のステップとして、サプレッサー機能を持つとされているT γ 細胞(IgGのFcリセプター陽性T細胞)を分離採取して、一定のB rich細胞分画に加え、T γ /B細胞比を0, 1, 4, 8と増加させてIg産生細胞数の増減をみると、期待通りのIg産生細胞数の減少傾向が認められ、特にCAHでの減少はほぼ直線的であった。したがってヘルパー機能を持つとされるT μ 細胞を含まず、T γ 細胞のみでB rich細胞とPWMの存在下で反応させると、サプレッサー活性が露出した姿で現われるものと考え。このような実験方法を用いた研究はまだ報告されていない。そして前述のT細胞分画中での陰陽作用拮抗論に矛盾しない成績である。

T細胞分画をCon Aで処置するとサプレッサー活性が強く出現することが知られている¹⁷⁾²⁴⁾ので、これを用いて慢性肝炎のサプレッサー活性を観察した報告がある⁷⁾⁹⁾。しかしこの方法は、未処置のT細胞分画やT γ 細胞分画の同活性を直接測定するものではなくて、人工的に増強された、然も完成したサプレッサーT細胞以外の誘導された細胞(サプレッサーT前駆細胞と推定)の活性を測定する方法であるため、自然な姿でのサプレッサー活性を意味しない。しかしこのよ

うな方法を用いても、CAHでは健常者に比べて著明なサプレッサー活性の低下があり、CIHではより軽い同活性の低下が認められた。この低下は、レスポナーとしてB rich細胞を用いて、PWM刺激下でそのIg産生細胞分化をみても確認されるのみならず、レスポナーとして全リンパ球を用い、Con A刺激下でその幼若化を測定しても同様であったので、Con A誘導によるT細胞のサプレッサー作用はB細胞系にもT細胞系にも働くのであって¹⁷⁾²⁴⁾²⁵⁾、その作用がCAHでは低下していることがわかった。

残された問題点は、CAHの患者T細胞分画の中で、サプレッサー機能を持つT γ 細胞の占める比率が健常者に比べて増加しているのに、サプレッサー活性は逆に低下しているのは何故であろうかということである。T γ 細胞はIgGのFcリセプターを持った細胞であるから、antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)では、その標的細胞膜に結合した膜抗体IgGのFc部分とT γ 細胞とが結合して、標的細胞を障害する活性をもつとされている²²⁾。したがってT γ 細胞には、BやT細胞系に作用してその免疫反応を阻止する活性をもつものと、ADCCに作用するものが別々の分業制であると仮定すると、T γ 細胞のpopulationとサプレッサー能とは並行しないのが当然であろう。またT γ 細胞からT μ 細胞へのin vitroでの変換やT γ + μ 細胞の存在も報告されている²⁶⁾ので、これも上記の矛盾所見を説明するのに十分である。さらにサプレッサー能をもつT細胞がTnon γ やTnon μ にも或る状態下では存在すると報告されている²⁷⁾²⁸⁾。これらの報告からすると、T γ 細胞のpopulationとサプレッサー能とが並行しない現象が存在してもよいと考える。そしてCAHのT γ 細胞は、健常者と比べて、数的比率では高値を示すが、サプレッサー機能では低値を示す特色を免疫異常の一つとして持った疾患であると思われる。これと同様の現象は、最近当教室において、ヒト消化器癌疾患の末梢血と転移陽性リンパ節との両方に認められ²⁹⁾、上記のT γ 細胞のpopulationと機能との間における矛盾的な所見は、非特異的免疫能の減退した状態を反映しているのであろうと考えている。

結 論

慢性肝炎患者末梢血リンパ球のT細胞population, T細胞サブセット(T γ , T μ)、さらにヘルパー、サプレッサー機能を検索し、以下の成績をえた。

1. 慢性肝炎患者末梢血ではT細胞population

が減少し、T細胞中に占めるT γ 細胞 population は増加した。

2. 慢性活動性肝炎患者のT細胞分画は健常者のそれに比べて、PWM存在下でのB細胞のIg産生細胞分化をより促進した。

3. T細胞分画にX線を照射し、サプレッサー活性を阻止して2と同一の実験を行なうと、健常者と慢性活動性肝炎患者との間には、Ig産生細胞分化の促進に差はなかった。したがって慢性活動性肝炎患者のT細胞分画中のヘルパー活性は健常者と同一であった。

4. 健常者、慢性肝炎患者共に、T細胞のB細胞に対する比率を増加させ、PWM存在下で両者混合培養しても、Ig産生細胞数の増減はなく、T細胞分画中のヘルパー、サプレッサー活性は相拮抗しているものと考えられた。

5. T細胞分画にX線を照射し、B細胞に対する比率を増加させ、PWM存在下で両者混合培養すると、健常者、慢性肝炎患者共に、Ig産生細胞数は直線的に増加し、両者に差はなかった。

6. T γ 細胞分画を分離し、B細胞に対する比率を増加させ、PWM存在下で両者混合培養すると、Ig産生細胞数は著減し、比率の増加に伴ない減少していく傾向がみられたが、健常者と慢性肝炎患者に差はなかった。

7. Con Aの前処置で予めサプレッサー活性を誘導したT細胞分画は、B細胞のIg産生細胞分化への阻止力とリンパ球幼若化への阻止力を発揮するのに、慢性活動性肝炎患者では著明にその阻止力が低下し、慢性非活動性肝炎患者では軽度低下していた。

以上の成績より、慢性活動性肝炎患者ではサプレッサーT細胞機能低下があり、ヘルパーT細胞機能には異常を認めなかった。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました。恩師太田五六教授に深く感謝の意を表すると共に御協力いただいた野々村昭孝助教授はじめ第2病理学教室の諸先生方に心から感謝いたします。

また貴重な臨床例を提供してくださった本学第1内科服部信教授および肝臓グループの諸先生方と、国立金沢病院内科、杉岡五郎部長および諸先生に感謝します。

なお、本研究は昭和54年度文部省科学研究費補助金(477249)の援助により行なったことを記し、感謝の意を表します。

文 献

1) 菅大三, 菅真美, 西村秀男, 西岡幹夫, 竹本忠良, 加藤征治, 粟屋和彦: 肝疾患におけるT cell subsetの動態と血清因子. 消化器と免疫No. 3. 東京, 医歯薬出版,

127 - 132 (1979)

2) Carneiro De Moura, M. & Ramalho, F. : T-lymphocyte subpopulations in chronic active hepatitis. (meeting abstract) Ital. J. Gast. 10, 176 - 177 (1978)

3) Facchini, A., Stefanini, G. F., Mariani, E., Miglio, F. & Gasbarrini, G. B. : Suppressor T γ lymphocytes in chronic active hepatitis. (meeting abstract) Ital. J. Gast., 10, 181 (1978)

4) Miller, D. J., Dwyer, J. M. & Klatskin, G. : Paucity of lymphocytes with receptors for Fc IgG in livers of patients with acute and chronic hepatitis B virus (HBV) infection. (meeting abstract) Clin. Res., 26, 323A (1978)

5) 永島成晃, 畔柳武雄: 肝疾患患者におけるT γ とT μ 及び免疫学的検討. (第15回日本肝臓学会で発表. 大阪), 1979.

6) 矢田和秋, 各務伸一, 櫻尾富二: 急性・慢性肝疾患におけるSuppressor T cell機能. 消化器と免疫No. 2. 東京, 医歯薬出版, 153 - 157 (1979)

7) 櫻尾富二, 堀田良, 矢田和秋, 各務伸一: 慢性肝疾患患者のCon A誘導によるSuppressor cell活性について. (第15回日本肝臓学会で発表, 大阪), (1979)

8) 杉浦克明, 武内重五郎, 矢田純一: 慢性肝疾患における suppressor activity について, (第21回日本消化器病学会秋季大会で発表, 前橋), (1979)

9) Böyum, A. : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl. : 97), 77 - 89, 1968.

10) 矢田純一: ヒトT細胞における免疫グロブリン産生のHelper能ないしSuppressor能の測定法の工夫. アレルギー, 26, 17 - 19 (1977)

11) Kaplan, M. E., Woodson, M. & Clark, C. : Detection of human T lymphocytes by rosette formation with AET-treated sheep red cells. In vitro Methods in Cell-Mediated and Tumor Immunity. New York, Academic Press, INC. 83 - 88 (1976)

12) Parish, C. R. & Hayward, J. A. : The lymphocyte surface I. Relation between Fc receptors, C'3 receptors and surface immunoglobulin. Proc. R. Soc. Lond. B. 187, 47 - 63 (1974)

13) 橋武彦, 石川美智子, 中沢真平: ヒト・リンパ球,

T細胞, B細胞の微量測定法. 免疫実験操作法Ⅲ. 金沢, 日本免疫学会編: 683 - 687 (1973)

14) 新保敏和, 矢田純一, 中川俊郎, 漆畑修, 松元正: ヒト IgG - Fc receptor 陽性 T リンパ球の検出法と各種疾患における変動. 臨床免疫. 9, 141 - 145 (1977)

15) Siegal, F. P. & Siegal, M. : Enhancement by irradiated T cells of human plasma cell production : Dissection of helper and suppressor functions *in vitro*, J. Immunol. 118, 642-647 (1977)

16) Moretta, L., Webb, S. R., Gross, C. E., Lydyard, P. M. & Cooper, M. D. : Functional analysis of two human T cell subpopulation : Help and suppression of B cell response by T cell bearing receptor for IgM and IgG. J. Exp. Med., 146, 184-200 (1977)

17) Kuritani, T., Hirano, T., Kishimoto, T & Yamamura, Y. : *In vitro* immune response of human peripheral lymphocytes. II. Properties and functions of concanavalin A-induced suppressor T cells. Microbiol. Immunol. 23, 185-195 (1979)

18) Shou, L., Schwartz, S. A. & Good, R. A. : Suppressor cell activity after concanavalin A treatment of lymphocytes from normal donors. J. Exp. Med., 143, 1100-1110 (1976)

19) Eddleston, A. L. W. F. & Williams, R. : Inadequate antibody response to HBAg or suppressor T-cell defect in development of active chronic hepatitis. Lancet, iii 1543 - 1545 (1974)

20) Moretta, L., Ferrarini, M., Durante, M. L. and Mingari, M. C. : Expression of a receptor for IgM by human T cells *in vitro*. Eur. J. Immunol., 5, 565-569 (1975)

21) Moretta, L., Ferrarini, M., Mingari, M. C. Moretta, A. & Webb, S. R. : Subpopulation of

human T cell identified by receptors for immunoglobulin and mitogen responsiveness. J. Immunol., 117, 2171-2174 (1976)

22) Jandinski, J., Cantor, H., Takakuma, T., Peasy L. & Pierce, C. W. : Separation of helper T cell from suppressor T cell expressing different Ly antigen. J. Exp. Med., 143, 1382-1390 (1977)

23) Moretta, L., Mingari, M. C. Webb, S. R., Pearl, E. R., Lydyard, P. M., Grossi, C. E., Lawton, A. R. & Cooper, M. D. : Imbalances in T cell subpopulations associated with immunodeficiency and autoimmune syndromes. Eur. J. Immunol., 7, 696-700 (1977)

24) Haynes, B. F. & Fauci, A. S. : Activation of human B lymphocytes. III. Concanavalin A-induced generation of suppressor cells of the plaque-forming cell response of normal human B lymphocytes. J. Immunol., 118 2281-2287 (1979)

25) Sakane, T. & Green, I. : Human suppressor T cell induced by concanavalin A : suppressor T cells belong to distinctive T cell subclass. J. Immunol., 119 1169-1178 (1977)

26) Pichler, W. J., Lum, L. & Broder, S. : Fc receptors on human T lymphocytes. 1. Transition of T γ to T μ cells. J. Immunol., 121 1540-1548 (1978)

27) Sakane, T. Steinberg, A. D., Patton Reeves, J. & Green, I. : Studies of immune functions of patients with systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest., 64 1260-1269 (1979)

28) Haynes, B. F. & Fauci, A. S. : Activation of human B lymphocytes. J. Immunol., 121 559-565 (1978)

29) 今井武司: 消化器癌患者における T細胞サブセットとサブレッサー機能について, 金沢大学十全医学会雑誌, 89 133 - 143 (1980)

T Cell Subsets and Helper and Suppressor Functions in the Peripheral Blood from Patients with Chronic Hepatitis. Mikio Tanino, Department of Pathology (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Juzen Med. Soc.*, **89**, 273-283 (1980).

Abstract 1. Patients with chronic hepatitis showed a significantly increased percentage of T γ cells in the whole T cells ($P<0.01$), while T cell population significantly decreased ($P<0.01$), as compared with the results of healthy subjects.

2. T cell fraction from patients with chronic active hepatitis (CAH), when cultured with certain B cell fraction with pokeweed mitogen, produced a significant increase in number of immunoglobulin (Ig)-producing cells ($P<0.01$) in comparison with that of healthy subjects.

3. Experiment of X-ray irradiation of the T cell fraction in order to inactivate selectively suppressor activity revealed that there was no significant difference in helper activity in a production of Ig-producing cells between patients with CAH or chronic inactive hepatitis (CIH) and healthy subjects. Therefore, augmentation of Ig-producing cells, shown in 2, may have resulted from reduced suppressor activity of the T cell fraction from patients with CAH.

4. Such a reduction was not amplified by stepwise increase of mixing ratio of T/B cells, suggesting that both suppressor and helper activities may act competently in the test system.

5. In contrast, previous irradiation of X-ray to each T cell fraction before culturing in the way similar to before, produced significant increase in number of Ig-producing cells depending upon increasing ratio of the T cells to B cells. Furthermore, isolated T γ cell fraction, when cultured similarly, gave rise to marked reduction in number of Ig producing cells. There was, however, no difference in suppressor activity between the T cell fraction from patients with CAH and that from the control.

6. Concanavalin A-induced suppressor activity of the T cell fraction significantly reduced in patients with CAH ($P<0.001$) and moderately in those with CIH ($P<0.01$), as compared with that in healthy subjects.