

フローサイトメトリーを用いた健常者および アトピー性皮膚炎患者の末梢血Th 1 / Th 2 細胞比に関する解析

Flow Cytometric Analysis on Th 1 / Th 2 Cell Ratio in Peripheral Blood from Healthy Individuals and Patients with Atopic Dermatitis

小島 弘幸 内野 栄治 寺井 格
都築 俊文 長谷川 浩*

Hiroyuki Kojima, Eiji Uchino, Itaru Terai,
Toshifumi Tsuzuki and Hiroshi Hasegawa

緒 言

近年増加傾向にあるアレルギー性疾患の病態は、サイトカイン産生パターンの異なる2つのヘルパーT細胞の相対的バランスによって説明されるようになった¹⁾。Fig. 1に示すように、インターフェロン・ガンマ (interferon-gamma: IFN- γ) やインターロイキン (interleukin: IL) -2等のサイトカインを産生するI型ヘルパーT細胞 (Th 1) は細胞性免疫を誘導し、IgE産生を抑制する方向に働く。また、IL-4、IL-5、IL-10等のサイトカインを産生する2型ヘルパーT細胞 (Th 2) は抗体産生を中心とした液性免疫を誘導し、IgE産生の亢進や好酸球の増殖・活性化に参与する。

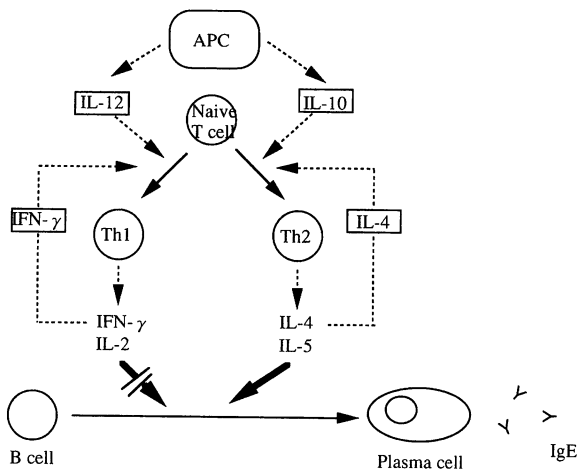


Fig. 1 Influence Th1/Th2 Balance on IgE Production from B Cell

アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis: AD) 患者の末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells: PBMCs) の培養上清を用いた研究において、Reinholdら²⁾はPBMCsから生産されるIFN- γ が低下していること、またRoussetら³⁾は、IFN- γ 低下の他に、IL-4が増加していることをそれぞれ報告している。これらを含む多くの報告が、アトピー性疾患の患者は健常者に比べTh 2が優位であることを指摘している。

最近、ヒトPBMCsを刺激培養する際に蛋白分泌抑制作用を有する薬剤、brefeldin A (BFA) やmonensinを用いて細胞内にサイトカインを蓄積させた後、フローサイトメトリーによりサイトカイン産生細胞を検出する方法が報告されている⁴⁻⁶⁾。この方法の特徴は、個々の細胞レベルで発現している数種類のサイトカインを同時に検出でき、多重染色を用いることにより細胞サブセット別に細胞内サイトカインを解析できることである。

今回我々は、このフローサイトメトリー法を用いてAD患者における末梢血Th 1およびTh 2のサイトカイン産生能を、健常者のそれと比較検討した。すなわち、ヘルパーT細胞はCD4陽性T細胞に属することから、CD4陽性T細胞に占めるIFN- γ およびIL-4産生細胞の比率を測定した。得られたサイトカイン産生細胞の比率より、末梢血Th 1/Th 2細胞比を算出したところ、AD患者での細胞比の著しい低下が認められたので報告する。

方 法

1. 対 象

健常者は既往歴、家族歴にアトピー疾患のない当所職員5名 (男性3名、女性2名)、AD患者は血清IgE値がそ

それぞれ20,000および6,000 IU/ml (健常者: <250) の男女各1名である。

2. PBMCsの調製

ヒト静脈より末梢血20 mlを抗凝固剤ヘパリンナトリウム (持田製薬) を用いて採血した。採取した末梢血をphosphate-buffered saline (PBS) で2倍に希釈した後、Ficoll-Paque (Pharmacia 社) に静かに重層して比重遠心分離した (室温、1,500 rpm、30分間)。中間層のPBMCs画分を回収し、PBSで3回洗浄後、 2×10^6 cells/mlの濃度になるように10%ウシ胎児血清 (Gibco 社) を含むRPMI-1640培養液 (Iwaki) に浮遊させた。

3. 細胞の刺激培養

PBMCs浮遊液1 mlをポリスチレン製チューブ (Falcon 2058) に分注し、phorbol 12-myristate 13 acetate (PMA, Sigma 社)、ionomycin (Sigma 社) およびBFA (Sigma 社) をそれぞれ終濃度25 ng/ml、1 μ g/mlおよび10 μ g/mlのなるように添加し、7%CO₂存在下にて37℃、4時間培養した。

4. 細胞膜表面抗原の標識および細胞膜透過処理

細胞培養終了後、遠心して沈降させた細胞に、phycoerythrin-cyanine 5 (PE-Cy 5) 標識抗ヒトCD4抗体 (Coulter 社) を20 μ l加え、室温暗所にて20分間反応させた。0.5%ウシ血清アルブミンを含むPBSで洗浄後、1 \times FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson 社) 2 mlを添加して室温で10分間反応させ細胞膜透過前処理を行った。洗浄後、1 \times FACS™ Permeabilizing Solution (Becton Dickinson 社) 0.5 ml加え、室温で10分間反応させ細胞膜透過処理を行った。

5. 細胞内サイトカインの染色

細胞膜透過処理した後、洗浄した細胞に fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒトIFN- γ 抗体/phycoerythrin (PE) 標識抗ヒトIL-4抗体 (Becton Dickinson 社) 20 μ l添加し、室温暗所で20分間反応させた。さらに洗浄後、PBS 0.5 mlに浮遊させ、4カラー対応フローサイトメトリー装置Coulter XL system IIを用いて細胞内サイトカインを検出し、産生細胞比率を測定した。なお、これら抗体の細胞への非特異的な結合に対するコントロール (isotype control: IC) として、FITC標識マウスIgG 2 a/PE標識マウスIgG 1 (Becton Dickinson 社) をそれぞれ反応させ同様に測定した。

6. フローサイトメトリーによる細胞内サイトカインの測定

最初に前方散乱光 (forward scatter: FS) および側方散乱光 (side scatter: SS) のパラメーターより、得られた細胞集団から混入した赤血球および単球を除くため、リンパ球集団にgate設定を行った (Fig. 2-a)。つぎにCD

4およびSSパラメーターを用い、得られたリンパ球集団からCD4陽性細胞集団にgate設定を行った (Fig. 2-b)。得られたCD4陽性T細胞集団について、IFN- γ ・FITCおよびIL-4・PEの2カラードットプロット表示に展開し、取り込んだ約10,000のgateイベントからTh1およびTh2の各細胞比率 (%) を算出した。なお、各細胞比率は、IC染色による細胞比率を差し引いた数値で表した。

結 果

1. 健常者の末梢血CD4陽性T細胞におけるIFN- γ およびIL-4産生細胞の比率

健常者のPBMCsをBFA存在下PMA+ionomycinで刺激し、CD4陽性T細胞内で産生されるIFN- γ およびIL-4をフローサイトメトリーで解析した。健常者における典型的なサイトカイン産生細胞の2カラードットプロット表示をFig. 2-cに示した。また、対応するICのドットプロット表示をFig. 2-dに示した。IFN- γ 産生細胞 (gate: B4) は34.8%認められ、IL-4産生細胞 (gate: B1) は4.1%認められた。一方、IC染色では非特異的な反応をほとんど認めなかった。この結果を含む健常者5名のCD4陽性T細胞に占めるIFN- γ 産生細胞およびIL-4産生細胞の比率をFig. 3に示した。Th1サイトカインであるIFN- γ を産生するCD4陽性T細胞は、平均 $29.9 \pm 8.1\%$ (18.7~39.5%) とばらつきはあるものの高い割合で存在していた。一方、Th2タイプのサイトカインであるIL-4を産生するCD4陽性T細胞は、平均 $2.8 \pm 1.6\%$ (1.3~4.9%) とIFN- γ に比べ、かなり低い割合で存在していた。

2. AD患者の末梢血CD4陽性T細胞におけるIFN- γ およびIL-4産生細胞の比率

AD患者のPBMCsをBFA存在下PMA+ionomycinで刺激し、CD4陽性T細胞内で産生されるIFN- γ およびIL-4を健常者の場合と同様にフローサイトメトリーで解析した。AD患者における典型的なサイトカイン産生細胞の2カラードットプロット表示をFig. 2-eに示した。また、対応するICのドットプロット表示をFig. 2-fに示した。IFN- γ 産生細胞 (gate: B4) は6.8%認められ、IL-4産生細胞 (gate: B1) は3.1%認められた。IC抗体を用いた染色では健常者の場合と同様に非特異的な反応は認められなかった。AD患者2名のIFN- γ 産生細胞およびIL-4産生細胞の割合をFig. 4に示した。IL-4産生細胞がそれぞれ3.1および4.2%と健常者とほぼ同レベルであったのに対し、IFN- γ 産生細胞はそれぞれ6.8および8.4%と健常者に比べ約4分の1に著しく低下していた。

3. 健常者およびAD患者のTh1/Th2細胞比

健常者およびAD患者の末梢血CD4陽性T細胞におけるIFN- γ 産生細胞(Th1)の比率をIL-4産生細胞(Th2)の比率で除することにより算定されたTh1/Th2細胞比の結果をFig.5に示した。健常者5名の平均は12.3 \pm 6.8(8.1~24.1)であるのに対し、2名のAD患者では、それぞれ2.2および2.0と健常者に比べ約6分の1の低下を

示した。健常者5名の平均は12.3 \pm 6.8(8.1~24.1)であるのに対し、2名のAD患者では、それぞれ2.2および2.0と健常者に比べ約6分の1の低下を

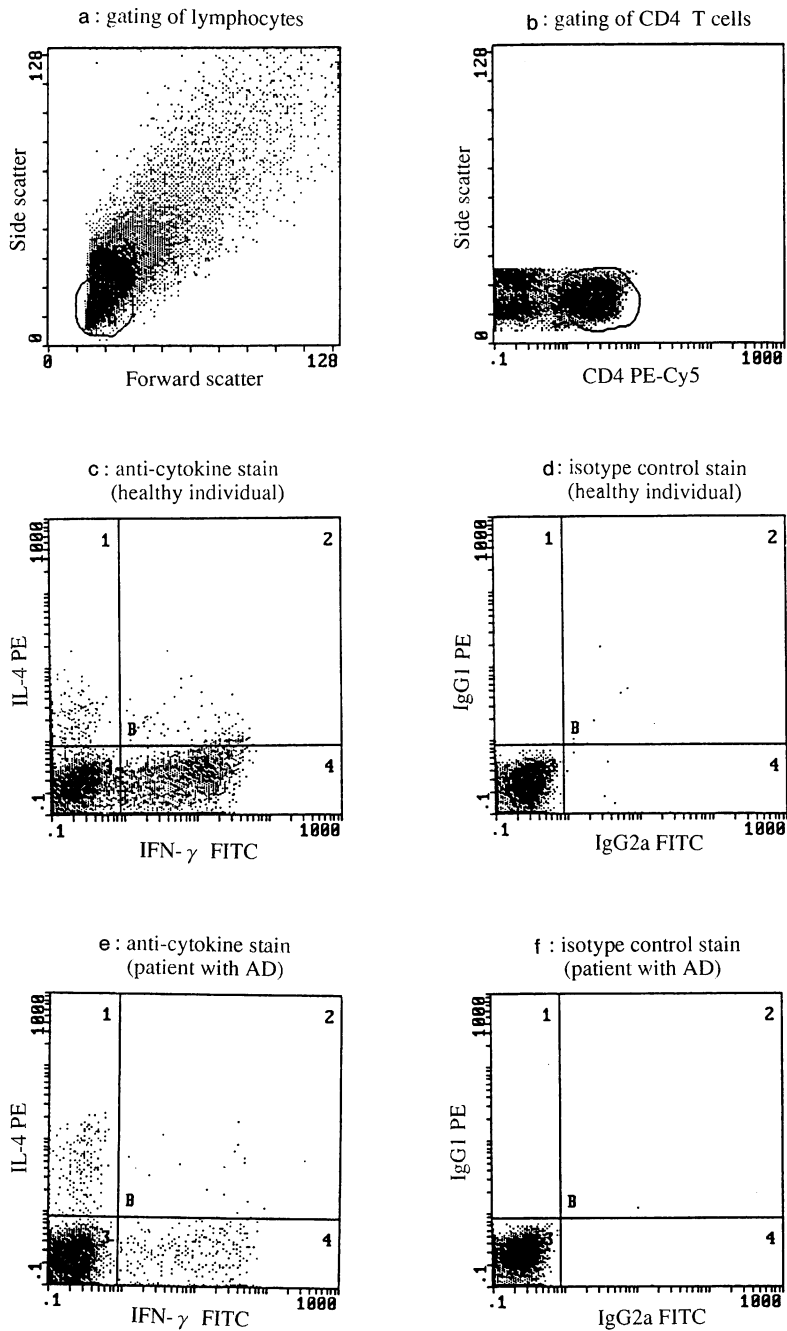


Fig. 2 Flow Cytometric Profiles on the Analysis of Th1 / Th2 Cell Ratio in Peripheral Blood from Healthy Individuals and Patients with Atopic Dermatitis

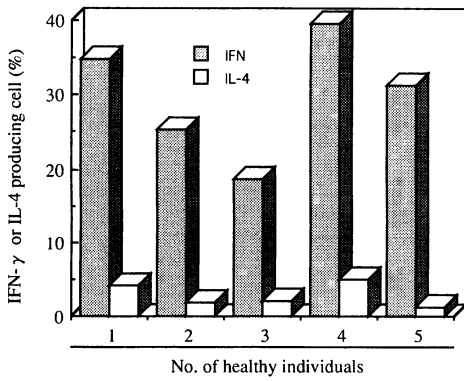


Fig. 3 Proportion of IFN- γ or IL-4 Producing Cells to CD4-positive T Cells in Peripheral Blood from Healthy Individuals

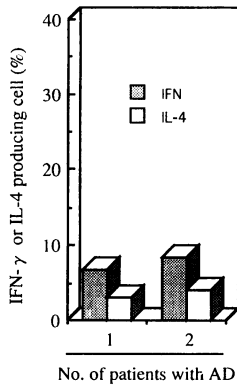


Fig. 4 Proportion of IFN- γ or IL-4 Producing Cells to CD4-positive T Cells in Peripheral Blood from Patients with Atopic Dermatitis

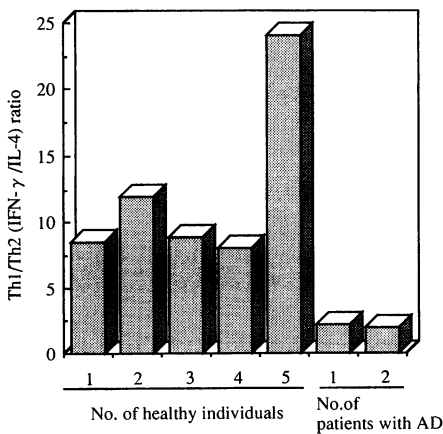


Fig. 5 Th1/Th2 Cell in Peripheral Blood from Healthy Individuals and Patients with Atopic Dermatitis

認めた。

考 察

Mosmannら^{7,8)}が、マウスのヘルパーT細胞はTh1とTh2の機能的亜群に分けられることを報告して以降、ヒトにおいても同様な分類が可能であることが示された⁹⁾。Fig. 1に示すようにTh1、Th2はCD4陽性T細胞に属し、いずれも未だ刺激を受けていないナイーブCD4陽性T細胞から分化する。この分化はナイーブCD4陽性T細胞が抗原刺激を受けて活性化される時に、マクロファージなどの抗原提示細胞 (antigen presenting cell: APC) が産生するIL-12¹⁰⁾やIL-10¹¹⁾、さらにNK1.1細胞、肥満細胞が産生するIL-4^{12,13)}などによって決定される。Th1が産生するIFN- γ はTh1の分化を、Th2が産生するIL-4はTh2の分化をそれぞれ選択的に誘導する。また、B細胞からのIgE産生において、IL-4は促進的に作用するが、IFN- γ は抑制的に作用することから、生体内でTh1が優位であるときはIgE産生は抑制されているが、Th2優位のときはIgE産生は亢進されると考えられている。

今回我々は、フローサイトメトリー法を用いてAD患者の末梢血Th1/Th2細胞比の解析を試み、健常者のそれと比較検討した。休止状態の末梢血T細胞では、サイトカインは通常産生されていないため、細胞をBFA存在下でPMAとionomycinを用いて刺激し、潜在的なサイトカイン産生細胞の比率を測定した。その結果、5名の健常者ではともにIL-4産生細胞 (Th2) に比べ、IFN- γ 産生細胞 (Th1) の比率が著しく高いことを認めた (Fig. 3)。この結果は、高阪ら¹⁴⁾がほぼ同様の方法で行った健常者15名についての結果 (IFN- γ : $32.69 \pm 11.66\%$ 、IL-4: $2.64 \pm 0.92\%$) と良く一致した。一方、極めて高い血清IgE値を示す2名のAD患者においては、Th2は健常者レベルに含まれるものの、Th1は健常者に比べ約4分の1に低下していることを見出した (Fig. 4)。これまでAD患者PBMCsのIFN- γ 産生能が低下していることは数多く報告されていたが^{2,3)}、今回のフローサイトメトリーを用いた方法により、AD患者2名においてCD4陽性T細胞に対するIFN- γ 産生細胞の比率が著しく低下していることをはじめ明らかにした。この細胞比率低下の原因がIL-12をはじめとするTh1分化誘導性サイトカインの異常によるものか否か明らかでないが、ADの病態に関連した非常に重要な要因を含んでいると考えられる。すなわち、このTh1比率の低下により、AD患者のTh1/Th2細胞比が健常者に比べ、約6分の1に低下していることが示され (Fig. 5)、Th2優位に傾いていることが示

唆された。このことは、血清 IgE 値が20,000および6,000と極めて高値である本 AD 患者の病態を反映しているものと考えられる。

Tangら¹⁵⁾は、重症 AD 患者の PBMCs を PHA で刺激し、培養上清中に生産されるサイトカインを測定したところ、Th 1 サイトカインである IFN- γ の産生が健常者のそれに比べ低下していることや、Th 2 サイトカインである IL-4 の産生が増加しているなど、AD 患者では Th 2 優位であることを報告している。また、笠松ら¹⁶⁾は、高感度 ELISA を用いて AD 患者の血清 IL-4 が健常者に比べ高値であることを報告している。今回の我々が得た結果では、AD 患者の末梢血 IL-4 産生細胞の比率は健常者レベルの範囲内にあり、特に高い値を示さなかった (Fig. 4)。このことは、本測定法による成績がサイトカイン産生量を反映しているのではなく、潜在的なサイトカイン産生細胞数を表していることによると考えられる。また、Th 2 は末梢血に比べ、皮膚などの炎症局所に組織浸潤して増えているとの報告もある¹⁾。アレルギー性疾患での Th 2 優位性については、遺伝的要因も含めて議論されており¹⁷⁾、このような Th 1 / Th 2 アンバランスの原因を探り、是正することは、現在増加の一途をたどるアレルギー性疾患の治療を考える上でも意義あることと思われる。

最近、アレルギー性疾患を含めて Th 1 / Th 2 バランスが崩れた状態が疾患の発症と関連することが示されている。Th 1 優位な疾患として多発性硬化症やインシュリン依存性糖尿病、Th 2 優位な疾患として気管支喘息などのアレルギー疾患や強皮性、骨髄移植後の慢性移植対宿主病が挙げられている¹⁸⁾。このことから、フローサイトメトリーを用いた Th 1 および Th 2 比率の測定は、今後様々な免疫に関連した疾患の診断に応用できることが考えられる。

現在、我々は道内の温泉を利用して AD に対する治療効果を検討しており¹⁹⁾、本法を用いた Th 1 / Th 2 細胞比の解析は、今後、AD 患者に対する温泉療法の治療マーカーの一つとして有用であることが考えられた。

結 語

アレルギー性疾患の病態は最近、2つのヘルパーT細胞 (Th 1、Th 2) の相対的バランスによって説明されている。今回我々は、フローサイトメトリーにより健常者5名およびアトピー性皮膚炎 (AD) 患者2名における末梢血

Th 1 / Th 2 細胞比に関する解析を行った。CD 4 陽性T細胞に占める IFN- γ および IL-4 産生細胞の比率から Th 1 / Th 2 細胞比を算出すると、健常者の 12.3 ± 6.8 (IFN- γ : $29.9 \pm 8.1\%$ 、IL-4 : $2.8 \pm 1.6\%$) に対し、AD 患者では 2.2 および 2.0 (それぞれ、IFN- γ : 6.8% および 8.4% 、IL-4 : 3.1% および 4.2%) と約6分の1の低下を認めた。このことから、AD 患者の末梢血では健常者に比べ、IFN- γ を産生する Th 1 が著しく低下しており、AD 患者の Th 1 / Th 2 バランスは Th 2 優位に傾いていることが示唆された。

終わりに、本報告は北海道立衛生研究所において平成7年度より開始された「健康科学プロジェクト研究」の一環として行ったことを付記する。

文 献

- 1) 柳原行義：医学のあゆみ，176(3)，167 (1996)
- 2) Reinhold, U. *et al.* : Clin. Exp. Immunol., **79**, 374 (1990)
- 3) Rousset, F. *et al.* : J. Allergy Clin. Immunol. **87**, 58 (1991)
- 4) Jung, T. *et al.* : J. Immunol. Methods, **159**, 197 (1993)
- 5) Ferrick, D. A. *et al.* : Nature, **373**(19), 255 (1995)
- 6) Picker, L. J. *et al.* : Blood, **86**(6), 1408 (1995)
- 7) Mosmann, T. R. *et al.* : J. Immunol., **136**, 2348 (1986)
- 8) Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. A. : Rev. Immunol., **7**, 125 (1989)
- 9) Romagnani, S. : Immunol. Today, **12**, 256 (1991)
- 10) Trinchieri, G. : Blood, **84**, 1008 (1994)
- 11) Fiorentino, D. F. : J. Immunol., **146**, 3444 (1991)
- 12) Yoshimoto, T. *et al.* : Science, **270**, 1854 (1995)
- 13) 青木一郎：臨床免疫，**29**，1072 (1997)
- 14) 高阪 勉他：医学と薬学，**38**(4)，875 (1997)
- 15) Tang, M. *et al.* : Clin. Exp. Immunol., **92**, 120 (1993)
- 16) 笠松正憲他：アレルギー，**42**，878 (1993)
- 17) 西村孝司：実験医学，**15**(11)，111 (1997)
- 18) 桑名正隆：臨床免疫，**30**(4)，461 (1998)
- 19) 内野栄治他：道衛研所報，**48**，1 (1998)

英文要約

It has been demonstrated that relative balance of two helper-T cells (Th 1, Th 2) is involved in the morbid state of allergy disease. We analysed the Th1/Th 2 cell ratio in peripheral blood from five healthy individuals and two patients with atopic dermatitis (AD) using flow cytometry. Based on the proportion of the number of intracellular cytokine IFN- γ and IL-4 producing cells to the number of CD4-positive T cells, Th 1/Th 2 cell ratio in heal-

thy individuals was 12.8 ± 6.8 (IFN- γ : $29.9 \pm 8.1\%$, IL-4 : $2.8 \pm 1.6\%$) and Th 1/Th 2 in AD patients was 2.2 and 2.0 (IFN- γ : 6.8% and 8.4%, IL-4 : 3.1% and 4.2%)

These results indicate that Th1 cells producing IFN- γ remarkably decreased in AD patients and Th 2 cells was predominant in AD patients compared with those of healthy individuals.

Key words : allergy; atopic dermatitis; cytokine; Th1/Th 2 balance; flow cytometry; IgE