

シンポジウム

免疫学の進歩—基礎と臨床—

HB ワクチン非応答性の解析

東京女子医科大学 消化器病センター 内科

ヤマウチ カツミ キムラ トモ ミヤゾノ ユウコ
山内 克巳・木村 知・宮園 裕子ヤマグチ ナオコ スズキ トモヒコ ハヤシ ナオアキ
山口 尚子・鈴木 智彦・林 直諒

(受付 平成9年2月28日)

Nature of Immunological Non-Responsiveness to HB Vaccine

Katsumi YAMAUCHI, Tomo KIMURA, Yuko MIYAZONO, Naoko YAMAGUCHI,
Tomohiko SUZUKI and Naoaki HAYASHIDepartment of Medicine, Institute of Gastroenterology
Tokyo Women's Medical College

To elucidate the precise mechanisms of low responsiveness to hepatitis B vaccine, we first examined the *in vitro* hepatitis B surface antigen (HBsAg)-induced proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from HB vaccinees. PBMC obtained from HB vaccine responders tended to respond well to HBsAg, whereas those from either low or non-responders did not. Furthermore, by the depletion of CD8 cells from PBMC, *in vitro* proliferative activity was restored in three low responders. Using PBMC of two HB vaccine low responders, we successfully established several different CD4 clones and found that at least four different T cells receptor β chain variable gene using clones existed. By the analysis of the synthesis of various cytokine from these clones, we demonstrated that both Th1 and Th2 type CD4 clones existed in these clones. In addition, we were able to establish CD8 Ts clones having an ability to suppress the function of HBsAg-reactive CD4 clones. Thus, our results indicate that while several HBsAg-reactive CD4 clones existed in HB vaccine low responders their function was suppressed by CD8 T cells.

はじめに

免疫反応の本質的な意義が他の生体反応と同じく、自己恒常性の維持にあると考えると、外来抗原に対して起こる免疫反応より、むしろ自己抗原等に対する免疫学的寛容状態の方に意味がある。この免疫学的寛容状態と呼ばれる現象は、1960年代に始まった近代免疫学における重要な問題として提出されたが、現在までその詳細な機序は不明である。免疫学的寛容状態は、一般臨床医の日常的な診察においても頻繁にみられる現象で、例えば、B型慢性肝炎の発生母地であるB型肝炎ウイ

ルス (HBV) 持続感染者 (キャリアー) がその一つの例である。このキャリアーをHBV表面抗原 (HBs抗原) に対して免疫学的寛容状態にあると考えると、これらのキャリアーにおける免疫学的寛容状態の機構を解析することは臨床的にみても重要な意味を持っている。

一方、免疫学的寛容状態に類似した現象は、ワクチン接種においてもみられる。HBV感染予防に有効なB型肝炎ワクチンでも、その接種者の約10%は、HBs抗体を産生できない非応答者である。これらのHBs抗原に対する免疫学的寛容状

態や、非応答性において重要な働きを担っている HBs 抗原特異的抑制性 T 細胞 (Ts) の働きについては既にいくつか報告がある^{1)~4)}。しかしながら、他の抗原に対する免疫反応における Ts と同様に、HBs 抗体産生における Ts の詳細な機序はよくわかっていない。

本論では、これまでに報告されてきた抗原特異的 Ts についての研究を含め、HBs 抗原に対する免疫学的抑制機構の特徴について概説する。

1. Ts の機能発現と MHC 分子

ある種のワクチンに対する非応答性と MHC 表現型との関連についてはいくつかの報告がある。中でも、Ts との関連で注目されるのは、DQ 抗原との相関や DQ 抗原と特定の疾患発病との相関についての報告である¹⁾²⁾、最終的に免疫反応を抑制する細胞が CD8 細胞と考えられているにもかかわらず、ある抗原に対する免疫抑制機能は MHC クラス II 抗原との拘束性があり、中でも DQ 抗原が、免疫抑制 immuno suppressor 遺伝子として作用しているらしいということについては既にいくつかの報告がある⁴⁾⁵⁾。例えば、Sasazuki らは、溶連菌細胞壁抗原、HBs 抗原、スギ花粉抗原および日本住血吸虫抗原に対する免疫応答性を解析し、その多くで非応答性が遺伝的に優性であり、HLA、特に DQ 抗原遺伝子と密接に関連していることを示した⁶⁾。一方、Algame らは、Leprae 抗原特異的 Ts クローンの抑制機構発現に、HLA-DQ の拘束性が認められると報告している⁷⁾。

この免疫抑制機構における DQ 抗原の役割について、Ts の誘導する際に働く抗原提示細胞上の DQ 抗原が外来抗原と複合体を形成し、これによって CD4 陽性の suppressor inducer 細胞 (Tsi) を活性化すると考えられている。

2. HBs 抗原に対する非応答性と免疫学的寛容状態の機構；HB ワクチン非応答性と HBs 抗原反応性 CD4 細胞

B 型肝炎ワクチンに対する非応答性における Ts の作用機序についても検討が行われてきた²⁾⁴⁾。我々はこれまでに、このような非応答性の機構をヒトの末梢血リンパ球 (PBL) を用いた HBs 抗原に対する T 細胞増殖能の実験系を用い

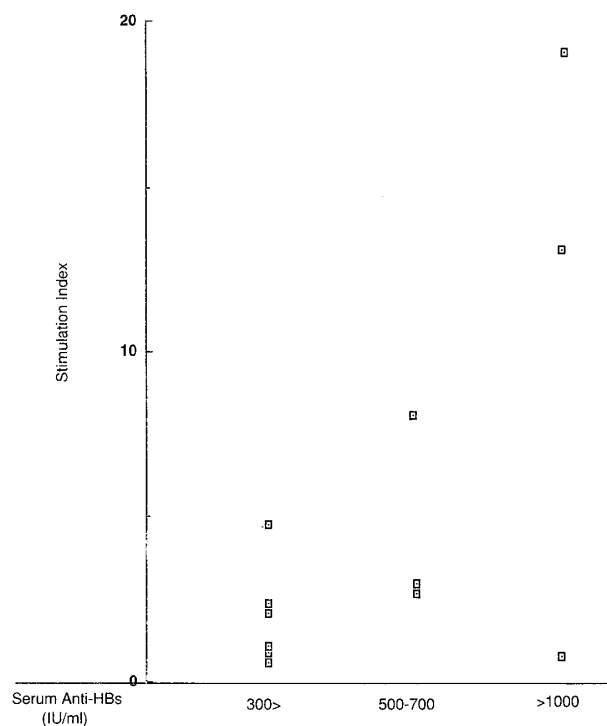


図1 ワクチン接種者リンパ球の *in vitro* における反応性と血中 HBs 抗体との関連
血中 HBs 抗体値により、3 群に分け、それぞれの接種者由来リンパ球の HBs 抗原に対する反応性を、SI (stimulation index) で表わした。

て解析を行った。この実験系の有用性は、*in vivo* においてワクチンに対して反応性の高い接種者は、*in vitro* においても HBs 抗原に対する反応性は高く、逆に、ワクチンに対して反応性の低い接種者のリンパ球は、*in vitro* においても HBs 抗原に対する反応性が低い傾向を示すことから明らかである (図1)。

次いで、このような HBs 抗原に対する無反応性の機序を検討する目的で、ワクチン低応答者のリンパ球から CD8 陽性細胞を除き同様の実験を行った。CD8 細胞を取り除いていない細胞群は、先の結果と同じく今回用いたいずれの HBs 抗原量によっても増殖能が認められなかった。しかしながら、同じリンパ球から CD8 細胞を取り除くことにより HBs 抗原に対する増殖活性が認められることが明らかとなった (図2)。

同様の実験は、図2に示すようにワクチンに対する低応答者3人で検討し、いずれにおいても、CD8 細胞を取り除くことにより、HBs 抗原に対す

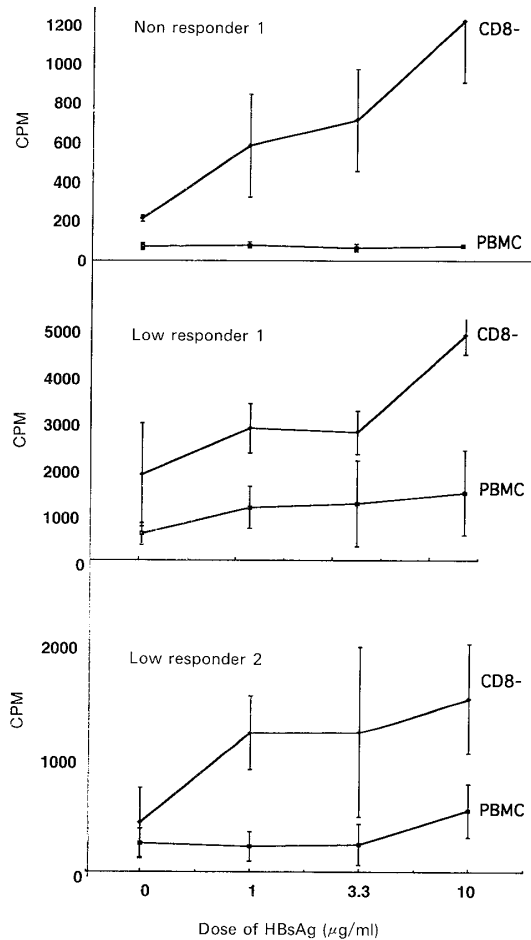


図2 ワクチン低応答者リンパ球のHBs抗原に対する反応性

3人のワクチン低応答者リンパ球のHBs抗原に対する反応性を、CD8細胞の有無により検討した。PBMCは、CD8T細胞を含むリンパ球、CD8-は同じリンパ球からCD8T細胞を取り除いてHBs抗原を加えてそれぞれの反応性を検討した。

る反応性が出現することが明らかになった。すなわち、*in vitro*におけるワクチン低応答者リンパ球の無反応性は、HBs抗原反応性T細胞の欠損や、抗原提示細胞の異常によるものではなく、CD8細胞による抑制機能によるものと考えられる。この結果は、我々が既に報告した結果とよく一致する。すなわち、ワクチン高応答者(HR)のリンパ球は*in vitro*においてもHBs抗体を産生するが、低応答者(NR)のリンパ球は抗体を産生できない。次に、ワクチン接種者のリンパ球をT細胞と非T細胞に分け、それぞれを組み合わせる混合培養を行った。その結果、NRのHBs抗体産生B細胞はワクチン接種初期には活性化されないが、

4週以降は抗体産生能を持つことが明らかとなった。また、NRのT細胞はワクチン接種後4週目には、HRの非T細胞の抗体産生を抑制する。このNRのT細胞の抑制活性は抗原特異的で、NRのT細胞からCD8陽性細胞を取り除くことによって、NRのリンパ球のHBs抗体産生の上昇が認められた。つまり、非応答性の反応初期はB細胞の低反応がワクチンに対する非応答性の主因であり、B細胞がHBs抗体を産生できるようになるワクチン接種4週以降では、Tsの存在が主な原因であるということが明らかにされた²⁾。

さらに、我々は、以上の事実を再検討する目的で、2例のワクチン低応答者リンパ球を用いて、HBs抗原と反応するCD4T細胞クローン細胞の確立を試みた。その結果、8クローンを作製できた。

これらのCD4陽性クローンT細胞は、いずれもHBs抗原刺激に対し特異的に反応し、他の抗原刺激に対しては反応しない。これらのクローン細胞の特徴をさらに検討する目的で、その表面上のT細胞レセプター(TCR) β 鎖V領域の解析を行った。その結果、これらのHBs抗原特異的CD4クローンは、少なくとも、4種類の異なったTCRV β 遺伝子を持っていることが明らかとなった(表)。

以上の結果は、HBワクチンに対する低応答者においても、高応答者と同様に、HBs抗原と特異的に反応するCD4細胞(ヘルパーT細胞)は存在しており、しかもいくつかの異なったクローンから成り立っていることを示している。

3. HBs抗原特異的Tsの解析

これまでに述べてきたように、HBワクチン低応答性においては、CD8陽性Ts細胞による抑制機能が重要な役割を担っていることが明らかとなった。一方、B型慢性肝炎の発生母地であるHBVキャリアーにおいても同様の抑制性T細胞の重要性は既にいくつか報告されている¹³⁾。しかしながら、その詳細な作用機序についてはいまだ明らかにされていない。我々はこれを検討する目的で、HBs抗原特異的CD4クローンの機能を抑制するCD8クローンを作製し、その解析を行った。

表 HBs 反応性 CD4クローンの TCRV β 分子の解析

CD4細胞	TCRV β 分子										
	2	3	5.1	6.1	8	12	13.1	14	16	17	20
TK-B3 line*	2	-	-	-	0.3	-	-	-	10	-	51.4
B3-2 clone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
B3-3 clone	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
B3-5 clone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TK-E5 line*	-	-	54.4	-	-	-	-	-	2.6	4.6	3.2
E5-8 clone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
E5-9 clone	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B3-5 clone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

*：クローンの元になった CD4 line の TCRV β を解析したもので、全体の細胞に対するそれぞれの TCRV β 陽性細胞の比率で表わした。
各クローンは、単一の TCRV β しか同定できないため-または+で表わした。

HB ワクチン非応答者にワクチンを接種し、HBs 抗原によって特異的に増殖する機能を持つ CD4クローンを作製した。また同様にワクチン接種者の末梢血リンパ球から CD8陽性細胞クローンを作製した。このようにして得られた CD8クローンを固層化抗 CD3抗体で2日間刺激し、その上清の、CD4陽性細胞の増殖能に対する抑制活性を測定すると、CD4クローンの HBs 抗原による増殖能を抑制する機能を持ち、IL-2による増殖活性は抑制できない。また、HBs 抗原による CD4クローン増殖反応に対して、CD8陽性クローンより得られた培養上清もまた、CD4クローン細胞の抗原特異的増殖能に対しては抑制活性を示すが、IL-2による増殖に対しては抑制活性は示していない。このことは、Multis らによって報告されている Ts の特徴と一致している⁸⁾。同様の CD8Ts クローンは、ワクチン低応答者のリンパ球を用いても作製できた。

以上のように、HB ワクチン接種者リンパ球を用いても誘導される Ts が、なぜ約10%の接種者(いわゆる NR)にのみ、*in vivo* においても誘導されるのかという点に関してはまだよくわかっていない。一つの可能性は、HB ワクチン応答性がある特定の HLA haplotype と連関することから、この特定の HLA haplotype は、DQ 抗原と HBs 抗原内の Ts エピトープと結合しやすく、その結果 Ts がこの haplotype を持つ接種者で選択的に起こると考えられる。この可能性は、Ts エピト-

プの解析と HLA-DQ 抗原との結合性の解析が必要であり、今後に残された問題である。

1980年代に入り、Ts の TCR について TCR β 遺伝子の再構成が認められない⁹⁾という報告がなされた。この報告や、H-2遺伝子座に I-J 分子をコードしている遺伝子が存在しない¹⁰⁾というような報告によって、Ts 細胞の存在そのものや、これまでの研究について疑問が投げかけられた。しかしその後、様々な抗原に対する特異的 Ts において TCR $\alpha\beta$ の表出や、再構成が報告されている^{11)~13)}。今回作製した抑制活性を有する CD8クローンの表面抗原をモノクローナル抗体を用いて解析したところ、これらの CD8クローンは TCR $\alpha\beta$ 陽性であり、さらに V β 遺伝子を解析したところ、V β 8のみが陽性であることが明らかとなった。

Ts による抑制機構は抗原特異的であることは、これまでに報告されているが、その一方でこの抑制機構においてサイトカインが重要な役割を担っているであろうと推測されている。そこで、今回作製した CD8クローンの培養上清中のサイトカインを測定した結果、IL-4, IL-10, γ -IFN がこの上清中に分泌されていることが確認された。これまでも、Ts が産生するサイトカインとして、IL-4, IL-10, γ -IFN などが注目されてきた。IL-4については、*M. leprae* に対するヒト Ts クローンの実験系で報告され⁹⁾、IL-10についてはマウスの Ts クローンをを用いて証明されている¹⁴⁾。

しかしこれらのサイトカインに対する抗体を用いても、その抑制活性を完全にブロックすることができない¹⁵⁾ことなどから、これらのサイトカインがTsの抑制活性にどのように作用しているかは不明であり、今後さらに検討していく必要があると考えられている。

おわりに

以上のように、HBs抗原に対する免疫学的寛容状態や、非応答性において、Tsが重要な役割を担っていることは明らかとされつつある。HBs抗原特異的Tsクローンが確立され、これらが分子レベルで詳しく解析されることによって、このような寛容状態におけるTsの作用機序がさらに明らかにされていくと考える。また、Tsの役割が明らかにされることにより、慢性肝炎発症における免疫学的背景が明らかにされる可能性があると考えられる。

文 献

- 1) **Dusheiko GM, Hoofnagle JH, Coolsley WG et al:** Synthesis of antibodies to hepatitis B virus by cultured lymphocytes from chronic hepatitis B surface antigen carriers. *J Clin Invest* 71 : 1104-1113, 1983
- 2) **Chiou SS, Yamauchi K, Nakanishi T et al:** Nature of immunological non-responsiveness to hepatitis B vaccine in healthy individual. *Immunology* 64 : 545-550, 1988
- 3) **Yamauchi K, Nakanishi T, Ciou SS et al:** Suppression of anti-HBs by factor made by T cells from HBsAg carriers. *Lancet* 13 : 324-326, 1988
- 4) **Watanabe H, Matsushita S, Kamikawaji M et al:** Immunesuppression gene on HLA-Bw54-DR4-Drw53 haplotype controls nonresponsiveness in human to hepatitis B surface antigen via CD8 suppressor T cells. *Hum Immunol* 22 : 7-9, 1988
- 5) **猪子英俊:** HLA-DQによる免疫抑制. *臨免疫* 21(6) : 945-975, 1989
- 6) **Sasazuki T:** HLA-linked immune suppressor genes. *Jpn J Hum Genet* 35 : 1-13, 1990
- 7) **Algame P, Convit J, Bloom B:** Immunological suppression by human CD8 T cell is receptor dependent and HLA-DQ restricted. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 2598, 1991
- 8) **Mutis T, Cornelisse YE, Datema G et al:** Definition of a human suppressor T-cell epitope. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 9456, 1994
- 9) **DeSantis R, Givol D, Hsu BM et al:** Rearrangement and expression of the alpha and beta T cell antigen receptor in functional murine suppressor T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 8338-8342, 1985
- 10) **Steinmetz M, Mirand K, Horvath S et al:** A molecular map of the immune response region from the major histocompatibility complex of the mouse. *Nature* 300 : 35-42, 1982
- 11) **Li SG, Elfrtink DG, de Vries RP:** Phenotypic and functional characterization of human suppressor T cell clones: II. Activation by *Mycobacterium leprae* presented by HLA-DR molecule to ab T-cell receptors. *Hum Immunol* 28 : 11, 1990
- 12) **Takata M, Laiti PK, Kubo RT et al:** Cloned suppressor T cells derived from mice tolerized with conjugates of antigen and monomethoxy-polyethylene glycol, relationship between monoclonal T suppressor factor and the T cell receptor. *J Immunol* 145 : 2846, 1990
- 13) **Collins M, Kurchroo VK, Kleerher K et al:** Expression of functional ab T cell receptor gene rearrangement in suppressor cell hybridomas correlate with antigen binding, but not with suppressor cell function. *J Immunol* 145 : 2809-2819, 1990
- 14) **Salgame P, Abrams JS, Clyberger C:** Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T-cell clones. *Sciences* 254 : 279-282, 1991
- 15) **Tada T, Inoue T, Asano Y:** Suppression of immune responses by cloned T cells and their products. *Behring Inst Mitt* 91 : 78-86, 1992