

原 著

岡本糸枝賞受賞論文

Behçet 病患者の末梢血における Interleukin-2
receptor 陽性 (IL-2R⁺) 細胞

東京女子医科大学 眼科学教室 (主任: 内田幸男教授)

小 暮 美 津 子

(受付 平成2年1月29日)

Interleukin-2 Receptor Positive Cells Peripheral Blood of
Patients with Behçet's Disease

Mitsuko KOGURE

Department of Ophthalmology (Director: Prof. Yukio UCHIDA)
Tokyo Women's Medical College

We evaluated the role of interleukin 2 (IL-2) system in regulating immune responses in Behçet's disease.

We determined the expression of IL-2 receptor (IL-2R), the capacity of production of IL-2 (IL-2P) and the subpopulations of IL-2R bearing lymphocytes in peripheral blood samples from 97 patients with Behçet's disease.

1) While the IL-2R values failed to show significant differences when compared to control, IL-2R was significantly higher in the patients than in control ($p < 0.001$).

2) The IL-2P levels were significantly elevated during exacerbation of the disease as compared to remission ($p < 0.01$). The IL-2R values remained at sustained high levels without significant fluctuation. The IL-2P values were elevated in cases with active ocular and extraocular manifestations of the disease ($p < 0.01$).

3) Both IL-2R and IL-2P values showed abrupt changes before and after ocular attacks of the disease.

4) The patients showed significantly more active T and B (IL-2R⁺) cells than in controls.

5) Systemic cyclosporin did not influence the IL-2R⁺ or IL-2P values.

6) There was no correlation between IL-2R⁺ and IL-2P values.

緒 言

成熟 T 細胞は抗原やマイトジェンで刺激されると interleukin-1 (IL-1) の存在下で活性化され、細胞表面に一過性に interleukin-2 receptor (IL-2R) を発現し、主としてヘルパー T 細胞からは interleukin-2 (IL-2) が産生される。IL-2R は IL-2 に特異的に反応する分子量 60,000~65,000 の糖蛋白質で、IL-2 の活性化は IL-2R との結合で開始さ

れる。活性化された B 細胞の表面にも IL-2R が発現し、IL-2 により増殖し、抗体産生を誘導する分子として働くことが知られている。IL-2 は分子量 55,000 の蛋白質で、T 細胞、B 細胞の増殖分化や natural killer (NK) 細胞の増殖などには必須な物質として働き、免疫応答における複雑な細胞間ネットワークの調節に重要な役割を演じる^{1)~4)}。

Behçet 病の原因は、なお不明であるが、その病

態には多彩な免疫異常の関与が示されている。本報告は Behçet 病患者を対象に IL-2R⁺細胞と IL-2P を測定し、さらに IL-2R⁺細胞の種類を解析し、これらの値と本症の臨床像との関わりを検討したものである。

対 象

Behçet 病患者97名の各臨床病期にヘパリン採血した末梢血延べ329検体を対象として用いた。患者の病型、眼病型の別、性別、平均年齢は表1に示した。対照には、これと性年齢構成のほぼ等しい健康成人35名を用いた。

方 法

1. IL-2R の測定

モノクローナル抗体抗 IL-2R (Becton Dickinson 社)を用い、laser flow cytometer で陽性を示

表1 対象

1. 病型			
	例数	男	女
完全型	52	28	24
不完全型	45	28	17
計	97	56	41
2. 眼病型			
	例数	男	女
眼底型	73	49	24
前眼部型	18	5	13
眼症欠如	6	2	4
3. 年齢	40.8±10.0歳		

す細胞の比率を算出した。

2. IL-2P の測定

Con A 刺激リンパ球の培養上清をマウス IL-2 依存性増殖細胞株に加え、その増殖能を³H-サイミジンの取り込みで測定し、Probit analysis を用いて表わした³⁾(表2)。

3. IL-2R⁺(活性化)リンパ球亜群の測定

活性化 T (IL-2R⁺・Leu 4⁺) 細胞の解析には Becton Dickinson 社のモノクローナル抗体抗 IL-2R (phycoerythrin 標識) と FITC 標識の抗 Leu 4 抗体を用い、活性化 B (IL-2R⁺・B₁⁺) 細胞の測定には、抗 IL-2R 抗体と FITC 標識抗 B₁ 抗体 (Coulter 社) を組み合わせた。

末梢血は ACD 液 (ニプロ社) 中に採取し、リンパ球を分離後、上記モノクローナル抗体で二重蛍光染色し、型のごとく flow cytometer (FACS アナライザー 1) で陽性細胞の百分率を求めた。

測定値の統計処理には X²検定、Wilcoxon 順位和検定その他を用いた。

結 果

1. IL-2R⁺細胞および IL-2P

1) Behçet 病の IL-2R⁺細胞および IL-2P

Behçet 病患者の IL-2R⁺細胞は対照にくらべて高値 (p<0.001) であったが、IL-2P は対照との間に有意の差がなかった (表3)。

両測定値は完全型、不完全型の病型間および各眼病型間で大きな差はなく、性差もみられなかつ

表2 IL-2産生能の測定方法

IL-2産生系 血液5mlHK ヘパリン容器にて保存 ↓ 単核球分離 ↓ 産生 medium で1×10 ⁶ 個/ml 調整 ↓ 96well 平底プレートに conA 7μg/ml + 調整液200μl ↓ (リンパ球絶対数2×10 ⁶ 個) 24h インキュベート ↓ 上清を採取(1500rpm10分遠心後) ↓ -20℃にて保存(*サンプル)	IL-2測定系 プレートに産生 medium を100μl 分注 medium control スタンダード 2 ⁻¹ ~2 ⁻⁵) 各々希釈 *サンプル 2 ⁻¹ ~2 ⁻³) ↓ CTLL-2を5×10 ⁴ 個/ml 調整し 100μl 分注(絶対数5×10 ³ 個) ↓ 21h インキュベート ↓ ³ H-TdR(0.25μCi) ↓ 8h インキュベート ↓ 測 定
---	--

た。

2) 発作期, 寛解期における推移

採血時に, 本症で再燃寛解を繰り返す諸症状のうち, いずれかが出現していた発作期と, これを全く認めない寛解期とに分けて, 各測定値を比較した。

IL-2P は発作期に有意に増加していたが, IL-2R⁺細胞には明らかな差が認められなかった(表4)。しかし, 両期の IL-2R⁺細胞の値を対照とくらべると, ともに明らかな高値 ($p < 0.001$) を維持していた。そこで, 発作期を症状の出現部位別に分けて Kruskal-Wallis の H 検定をし, 内容については更に多重検定したが, 発作の出現部位と両測定値との間に特別な関係はみられなかった。しかし, 両測定値は, ともに症状が単発している時よりも多発している時期に高い傾向を示していた。

3) 疾患の活動性(病勢)との関係

本症の長い経過のうちには病勢も変化する。病勢の程度は, 当教室でかねてから採用しているスコアを用いて表わした。スコアは眼症状と眼外症状とに分けて表5の基準に従い点数で表わした。各スコアは症例ごとに原則として過去1年間を調べ, 1カ月平均を求め, その値が全症例の合計スコアの平均値 \pm S.D.を越えるものを, それぞれス

表3 Behçet病末梢血のIL-2R⁺細胞(%)およびIL-2産生能

	Behçet病	対 照
IL-2R ⁺ 細胞* %	1.17 \pm 0.69 (235)	0.79 \pm 0.42 (35)
IL-2産生能 U/ml	9.64 \pm 7.38 (233)	8.46 \pm 5.99 (57)

()内検体数, * $p < 0.001$

表4 発作期, 寛解期におけるIL-2R⁺細胞およびIL-2産生能

	発作期	寛解期
IL-2R ⁺ 細胞 %	1.18 \pm 0.72 (166)	1.15 \pm 0.65 (69)
IL-2産生能* U/ml	10.19 \pm 7.46 (161)	8.51 \pm 6.98 (72)

()内検体数, * $p < 0.05$

コアの高い群, 低い群とした。

眼症状, 眼外症状の両方のスコアがともに高い群の IL-2P は, ともに低い群にくらべて有意に高値 ($p < 0.01$) を示したが, IL-2R⁺細胞は恒常的に高値で, スコアの高低間で差はみられなかった(表6)。

4) 眼発作前後の両測定値の変動

本症の眼発作は急激な視力低下で始まるため, 眼外発作にくらべると発症の時期を正確に把握することができる。ここで眼症状の経過は, 発作の起きた日から数えて5日間を眼発作期, それ以降, 消炎までを発作後期, 消炎後を寛解期, 眼発作前の5日間を発作前期とし, それぞれの IL-2R⁺細胞, IL-2P の値を図1に示した。眼発作前に一過性に低下していた IL-2R⁺細胞は, 眼発作とともに急激に増加し, 発作後期には低くなり, 各眼病期間で有意の差がみられた。しかし, 発作後期から寛

表5 疾患の活動性(病勢)を示すスコアの基準

眼外スコア	
スコア	眼外症状の出現頻度(1カ月間)
3	殆んど常に症状があらわれていた
2	症状がある日の方が多かった
1	症状の出現しない日の方が多かった
0	なにも起きなかった

眼スコア	
スコア	眼発作の程度
3	重 症
2	中 等 度
1	軽 度
0	な し

観察期間内に出現した各眼発作の程度を症状別にスコアであらわし, 1カ月平均のスコアを算出した。

表6 疾患の活動性との関係

	スコアの高い群	スコアの低い群
IL-2R ⁺ 細胞 %	1.23 \pm 0.87 (45)	1.14 \pm 0.58 (47)
IL-2産生能* U/ml	10.75 \pm 7.73 (44)	6.42 \pm 4.97 (45)

()内検体数, * $p < 0.01$

解期への移行は緩やかであった。IL-2PもIL-2R⁺細胞の動きとはほぼ同様で、眼発作期に最も高値で、発作前の値との間に有意の差 (p<0.05) がみられた。

5) IL-2R⁺細胞とIL-2Pとの関係

同時期に採血した検体でIL-2R⁺細胞, IL-2Pを測定することのできた226検体について、両者の関係を調べたが、有意の相関はなかった(図2)。発作期, 寛解期に分けて同様にPearsonの相関係数を求めたが、IL-2R⁺細胞とIL-2Pとの間に有意の相関は得られなかった。

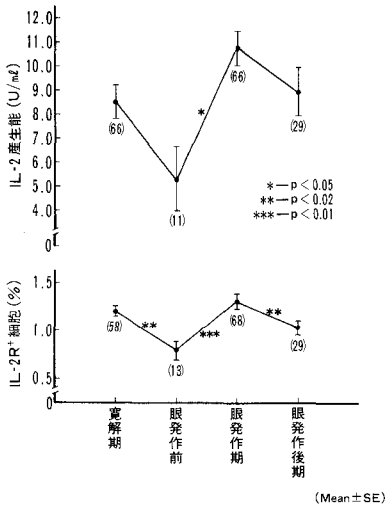


図1 眼発作を中心としたIL-2R⁺細胞およびIL-2産生能の動き

眼発作前の5日間を眼発作前期, 発作開始後5日間を眼発作期, それ以降, 消炎までを眼発作後期とした。

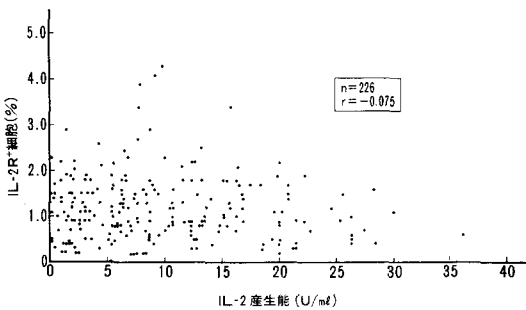


図2 IL-2R⁺細胞とIL-2産生能との関係

採血日の等しい226検体についてIL-2 R⁺細胞 (%)とIL-2産生能の相互関係を調べたが両者間に有意の相関はなかった。

しかしIL-2PはOKT4⁺(ヘルパー/インデューサーT細胞値との間に有意の相関を認めた(図3)。

6) シクロスポリン(CYA)療法の影響

眼活動性の高い難治例にはCYAが投与されている。表7にはCYA療法を行なっている14症例の内服前, 内服中の値を示した。両測定値は, CYA内服中に低下する傾向を示したが, 有意の差ではなかった。

7) 両測定値の発症後の推移

本症の初発症状出現後および眼発症後の両測定値の推移を経年的に検討し図4に示した。因みに本症の初発症状が出現し, 眼発症までの期間は平均4.7±1.5年であった。

両測定値の経年推移に有意の差はなかったが, 対照とくらべるとIL-2R⁺細胞は, 本症の発症当時からすでに高値で, 発症後も高値を維持していた。IL-2Pは対照との間に差を認めなかったが, 初発症状出現後4~5年, 眼発症後2~5年にかけてピークがみられた。

2. 活性化リンパ球亜群の解析

1) 活性化T細胞, B細胞

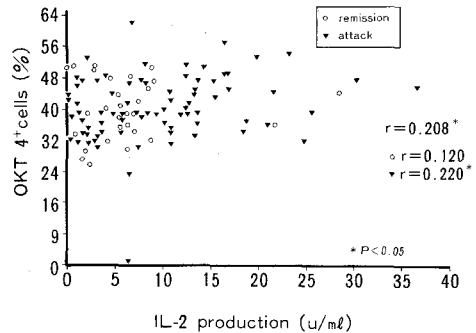


図3 OKT 4⁺細胞とIL-2産生能との関係

表7 シクロスポリン療法の影響

	シクロスポリン使用前	シクロスポリン使用中
IL-2R ⁺ 細胞 %	1.42±0.97 (21)	1.12±0.63 (63)
IL-2産生能 U/ml	11.93±5.96 (20)	10.23±6.83 (62)

()内検体数

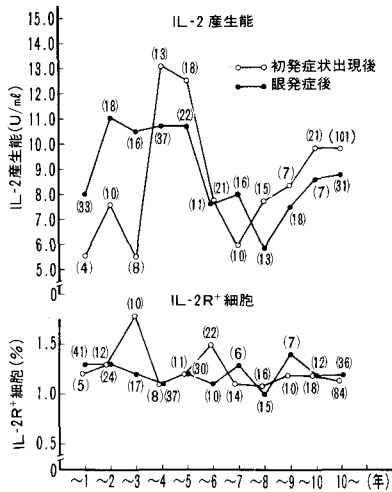


図4 発症後の経年的推移
発症当初からIL-2R+細胞は健常対照にくらべて高値(p<0.001)であった。()内は検体数を示す

表8 Behçet病のIL-2R+・Leu4+細胞およびIL-2R+・B₁+細胞 (Mean±SD)

	Behçet病 (49例94検体)	健常対照 (20例)
IL-2R+・Leu4+細胞* (%)	1.50±1.13	0.49±0.14
IL-2R+・B ₁ +細胞** (%)	0.20±0.21	0.08±0.07

* : p<0.001, ** : p<0.005

Leu4+細胞 : Tリンパ球, B₁+細胞 : Bリンパ球.

Behçet病患者の活性化T (IL-2R+・Leu4+)細胞, B (IL-2R+・B₁+)細胞は, ともに対照にくらべて有意に増加していた(表8).

またすべてのLeu4+細胞のうち, IL-2Rを発現している細胞の比率は, 患者群が対照にくらべて有意に増加していた. 同様な結果はB₁+細胞についても得られた(図5).

2) 発作期, 寛解期における変動

本症の発作期, 寛解期における活性化T細胞, B細胞の動きは表9に示した. お互いに有意の差はなかった. 発作期をさらに眼発作期と眼外発作期, 単発発作と重複発作に分け, 病勢についても, 発作の頻発するスコアの低い群と発作の少ないスコアの低い群とに分けて検討したが, 相互の間に明らかな差はみられなかった.

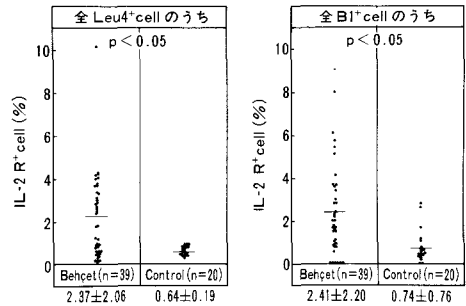


図5 T細胞, B細胞のうちIL-2Rを発現している細胞の比率
T (Leu4+)細胞はBehçet病が72.95±7.82%, 対照が75.34±5.53(%), B (B₁+)細胞はそれぞれ10.65±5.09(%), 12.20±4.59(%)であった.

表9 各臨床病期におけるIL-2R+・Leu4+細胞とIL-2R+・B₁+細胞 (Mean±SE)

	検体数	IL-2R+・Leu4+細胞 (%)	IL-2R+・B ₁ +細胞 (%)
発作期	51	1.58±0.15* ⁵	0.23±0.03* ⁵
寛解期	43	1.42±0.17* ⁴	0.17±0.03* ¹
単発発作	39	1.51±0.17* ²	0.22±0.03* ⁵
重複発作	12	1.78±0.28* ⁵	0.24±0.05* ⁴
シクロスポリン 使用群	47	1.39±0.14* ⁵	0.19±0.02* ³
シクロスポリン 非使用群	47	1.60±0.17* ⁵	0.21±0.02* ²

対照との間に*¹ : p<0.05, *² : p<0.01, *³ : p<0.02,

** : p<0.005, *⁵ : p<0.001.

3) 眼発作を中心とした動き

眼発作の起きた日を0として, その2日前から眼再発まで(-2~0日), 眼再発の1~3日後, 4~7日後の3病期に細分して活性化T細胞, B細胞の動きを調べ図6に示した.

活性化T細胞, B細胞の値は, ともに眼発作直前から発作の起きた当日にかけて最も高く, 以降は漸減傾向を示し, 活性化T細胞の眼発作-2~0日の値は, 4~7日後の値にくらべて有意(p<0.05)に高値であった.

4) CYAの影響その他

CYA内服前と内服中の患者, CYA使用患者と非使用患者(表9)について, 両測定値を比較したが, いずれもCYA療法を受けている患者群で低い傾向がみられたが, 有意の差はなかった.

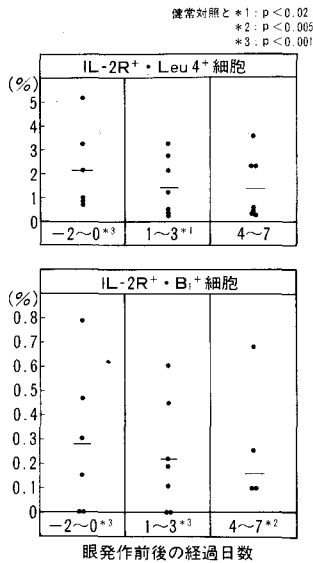


図6 眼発作を中心とした IL-2R⁺Leu4⁺細胞および IL-2R⁺B₁⁺細胞

また両測定値の初発症状出現後および眼発症後の経年的な推移にも有意の差はみられなかった。

考 察

リンパ球、なかでも T 細胞には、幾つかの分化・成熟過程があり、それに応じて異なった機能を獲得するが、同時に細胞表面の抗原性も変化する。近年では、この抗原性の変化をモノクローナル抗体で識別し、免疫異常のメカニズムを細胞レベルで推測することが可能となった¹¹⁻⁹⁾。

本報告では、Behçet 病患者を対象にモノクローナル抗体抗 IL-2R を活性化リンパ球のマーカーとして用い、種々の検討を行った^{6)~7)}。

それによると、Behçet 病の末梢血には IL-2R を発現し、活性化しているリンパ球が正常対照より明らかに増加していた。

ところで、正常 T 細胞における IL-2R の発現は、抗原やマイトジェンの刺激で up regulate され、IL-2 で down regulate されることが示されている⁹⁾。本症の場合、同時に測定した IL-2 産生能は正常対照との間に大きな差が認められなかった。

そこで、個々の症状の再燃寛解という transit な症状経過と諸症状の頻発する活動性の高い時期とそうでない時期との両側面から検討すると、病

期を反映して変動していたのは IL-2 産生能で、一方の IL-2R⁺細胞は恒常的に高値を維持していた。その上、この IL-2R⁺細胞の高値は、本症の発症当初から全経過を通じて観察されていた。

ところが、両測定値を通覧すると、明らかな個体差はなく、むしろ反復測定した症例内での変動が目について観察された。そこで発作寛解の時期が、自覚的にも他覚的にも明確にできる眼症状を中心に両測定値の動きを更に細かく検討しなおした。

この対象には、眼発作のみが頻発し、眼外症状の出現しない時期の症例を選んだ。その結果、IL-2 産生能のみならず、IL-2R⁺細胞の値も眼発作前後にかけて大きく変動することが示された。このことは、他の眼外症状の出現に当たっても経日的に観察できれば、把えられる所見と考えられた。

この眼発作前後における両測定値の動きは、丁度、この時期にかけての NK 活性⁸⁾やインターフェロン γ ⁹⁾、プロスタグランジン E₂¹⁰⁾の動きとも共通していて、本症の病態形成に IL-2 系もともに関わっている可能性を示唆するものであった。

次に、この活性化され、IL-2R を発現している細胞の種類、なかでもリンパ球亜群を二重蛍光染色を用いて検討した。それによると Behçet 病の末梢血では、健常対照にくらべて活性化された T 細胞も B 細胞もともに明らかに増加し、これは眼科的に詳細な検討では、やはり眼発作を契機に起こっていた。

以上は、本症の末梢血中には、対照より多くの比率で活性化された T 細胞、B 細胞が存在し、これらが、本症の病像形成や臨床経過に関与していることを示す所見であった。

本症患者の IL-2R に関しては、すでに坂根らが、Con A 刺激 T 細胞の IL-2 に対する反応性で検討し、低下を認めるが、IL-2 産生能は正常レベルを保っていたと報告している¹¹⁾。本報告での結果と IL-2R に関しては一致がみられないが、これは方法論的な相違によるものと考えられた。本報告の結果からは、IL-2 による down regulation の障害も疑われるが、推測の域にとどまる。

なお、本症の中でも視力予後の悪い眼底型病変

を有する患者の多くは、眼再発を抑制する目的で CYA が投与されている。CYA は T 細胞の IL-2 産生や IL-2R の発現を抑制するが、B 細胞には作用しないとされている¹²⁾。今回の検討では、CYA 内服例に IL-2 産生能、IL-2R⁺細胞の低下傾向がみられたが、いずれも有意の差ではなかった。

近年、IL-2R には、IL-2 に対する親和性の異なる 2 種類のレセプターの存在することが明らかにされ、T 細胞の増殖に関係するのは高親和性 IL-2R の方であることが示されている³⁾。いずれ、この方面の基礎的研究が進むにつれて、臨床的にもこれまでとは違った観点から病因が解明されて行くものと思われる。

本研究は昭和61年度岡本糸枝研究助成金の援助を受けて行なったものであることを付記する。

終りに臨み内田幸男教授の御校閲に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Kern DS, Gillis SM, Okada M et al: The role of interleukin-2 in the differentiation of cytotoxic T cells: The effect of monoclonal anti IL-2 antibody and absorption with IL-2 dependent T cell lines. J Immunol 127: 1323-1328, 1981
- 2) Handa K, Suzuki R, Matsui H et al: Natural killer cells as a responder to interleukin 2. J Immunol 130: 988-992, 1983
- 3) Gillis S, Ferm MM, Ou W et al: T cell growth factor: Parameters of production and a quantitative microassay for activity. J Immunol 120: 2027-2032, 1978
- 4) Tsudo M, Uchiyama T, Takatsuki K et al: Modulation of Tac antigen on activated human T cell by anti-Tac monoclonal antibody. J Immunol 129: 592-595, 1983
- 5) Gillis S, Mochizuki DY, Conlon PJ et al: Molecular characterization of interleukin 2. Immunol Rev 63: 167-209, 1982
- 6) Leonard WJ, Depper IU, Uchiyama T et al: A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor: Partial characterization of the receptor. Nature 300: 267-269, 1982
- 7) Burmester GR, Jahn B, Gramatzki M et al: Activated T cells in vivo and in vitro: Divergence in expression of Tac and Ia antigens in the non blastoid small T cells of inflammation and normal T cells activated in vitro. J Immunol 133: 1230-1234, 1984
- 8) Watanabe K, Ohashi Y: Natural killer cell activity in patients with Behçet's disease. Am J Ophthalmol 98: 813-814, 1984
- 9) Ohno S, Kato F, Matsuda H et al: Detection of gamma interferon in the sera of patients with Behçet's disease. Infect Immun 36: 202-208, 1982
- 10) 小暮美津子, 大曾根倫子, 吉川啓司ほか: Behçet 病のプロスタグランディン関連物質. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和60年度研究業績: 115-118, 1986
- 11) 坂根 剛, 鈴木 登, 村川洋子ほか: ベーチェット病患者におけるインターロイキン 2 活性の解析. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和60年度研究業績: 154-162, 1986
- 12) Palacios R: Cyclosporin A inhibits the proliferative response and the generation of helper, suppressor and cytotoxic T cell function in the autologous mixed lymphocyte reaction. Cell Immunol 61: 453-462, 1981
- 13) Robb RJ, Greene W, Rusk CM: Low and high affinity cellular receptors for interleukin 2. J Exp Med 160: 1126-1146, 1984