

## 慢性甲状腺炎患者における サイログロブリンによる T 細胞活性化

—橋本病における抗原呈示細胞の役割—

淡嶋 史佳・小出 幸夫\*・吉田 孝人  
船内 正憲\*\*・仁瓶 禮之\*\*・竹 廣 晃\*\*\*

### T-lymphocyte activation by thyroglobulin in patients with chronic thyroiditis

Fumiyoshi Awashima, Yukio Koide\*, Takato O. Yoshida,  
Masanori Funauchi\*\*, Reiji Nihei\*\*, Akira Takehiro\*\*\*

*Department of Microbiology, Department of Transfusion and Clinical Immunology\*,  
Third Department of Internal Medicine\*\*, and Department of Pediatrics\*\*\*,  
Hammamatsu University School of Medicine*

#### 【Summary】

The purpose of the present study is to assess the proliferative responsiveness of T-lymphocyte to thyroglobulin in patients with chronic thyroiditis.

T-lymphocyte proliferative responses were, first of all, induced by thyroglobulin (TG)-pulsed antigen-presenting cells (APC). According to the state of serum anti-thyroglobulin antibodies, T-lymphocyte from about a half of sero-positive patients showed the proliferative response to TG-pulsed APC while those from most sero-negative patients and healthy individuals did not respond.

In contrast, even sero-negative patients, whose T-lymphocyte did not show proliferative responses to TG-pulsed APC, showed T-lymphocyte proliferative responses when thyroglobulin was added into the culture medium.

Since antigen-pulsed APC are considered to activate almost exclusively helper T-lymphocyte, the lymphocytes which respond to free thyroglobulin in the culture medium seem to belong to more than a single subset including helper T-lymphocyte.

Taken together, these results suggest that T-lymphocyte which respond to TG-pulsed APC may play a significant role in the induction of anti-TG antibody production in patients with chronic thyroiditis.

**Key words :** Hashimoto's thyroiditis

thyroglobulin

antigen-presenting cell (APC)

T-lymphocyte proliferative response

### 【概 要】

慢性甲状腺炎の発症に重要な意味をもつ抗サイログロブリン抗体の産生機構を解明するため、その引き金と考えられる調節性T細胞の活性化の機構を主に、T細胞-抗原呈示細胞間相互作用のシステムで検討し、以下の結論を得た。

1) 抗サイログロブリン抗体陽性患者では、サイログロブリン・パルス抗原呈示細胞 (antigen-presenting cell) に対して、T細胞の増殖性反応陽性を示すものが高率に認められるが、抗サイログロブリン抗体陰性患者や健康人では低率であった。

2) 抗原呈示細胞、T細胞混合培養中にサイログロブリンを加えた系では、抗サイログロブリン抗体陽性患者は全例にT細胞増殖性反応が陽性となったが、抗サイログロブリン抗体陰性患者や健康人でもT細胞増殖性反応陽性となるものがあつた。とくに健康人では8例中4例に陽性となった。

以上のことにより、抗原 (サイログロブリン) パルス抗原呈示細胞を用いた系でのT細胞増殖性反応は、抗サイログロブリン抗体陽性患者に比較的特異的に陽性となることが示されたので、その意義について若干の検討を加えた。

## I. はじめに

慢性甲状腺炎 (chronic thyroiditis; CT) の発症機構については不明点が多いが、自然発症慢性甲状腺炎モデル動物では抗甲状腺抗体が主体をなし、実験的甲状腺炎では主に細胞障害性T細胞が関与するとされている<sup>1)</sup>。

また最近、ヒトCT患者では、抗サイログロブリン (thyroglobulin; TG) 抗体産生に関与する抑制性T細胞の機能が低下していることが報告され<sup>2)</sup>、他の自己免疫疾患と同様にT細胞とくに抑制性T細胞の機能低下がその発症に重要な役割を演じていると推察されている。しかしながら、T細胞依存性抗原であるTGがCT患者ではヘルパーT細胞をどのように活性化して抗TG抗体産生へと導くかは明らかではない。最近、可溶性抗原によるT細胞の活性化は抗原呈示細胞 (antigen-presenting cell; APC) によるT細胞への抗原呈示によっていることが、モルモット<sup>3)</sup>、マウス<sup>4)</sup>、そしてヒト<sup>5,6)</sup>で明らかとなっている。そこで筆者らは、抗TG抗体 (TgAb) 産生への引き金と考えられるT細胞-APC間相互作用が、TGを抗原としたとき、CT患者では実際に機能しているのかどうかを検討した。

## II. 材料および方法

### 1. 材料および対象

#### 1) サイログロブリンの精製

剖検時に得られた非甲状腺疾患患者の甲状腺を、Van

Herleらの方法<sup>7)</sup>により、ハサミで細切し2ml/gのphosphate buffered saline (PBS) を加え一昼夜攪拌した。これを1,000×gで遠心し、上清5mlをPBS pH 7.2で緩衝化したSephadex G-200 (Pharmacia) でゲルろ過を1分間3mlの流速で行い、3mlずつ分取し280nmの吸光度で最初に流出する分画 (分画 no. 23~29) を取り出し、これをサイログロブリン (TG) 分画とした。このうち、分画 no. 26の蛋白濃度をBiuret法で測定し、6.0mg/mlの試料を得た。これを用い抗サイログロブリン抗体 (TgAb) 陽性患者の血清と沈降反応を行ったところ沈降線を認め得た。

#### 2) 対象

対象は、当院内科・小児科通院中の慢性甲状腺炎患者で年齢は15歳~74歳 (おもに40歳~55歳) の女性15名、男性1名であった。このうち、TgAb陽性患者は10名、TgAb陰性患者は6名であった。また、コントロールとして健康者8名 (年齢25~35歳の女性6名、男性2名) を対象とした。なお、TgAbはサイロイドテスト (富士臓器) にて行い、陽性者の抗体価は×100~×819,200であった。また、マイクロゾームテストは患者の全例で陽性 (×100~×409,600) であった。ただし、健康者はすべてサイロイドテスト陰性であったが、マイクロゾームテストは行わなかった。

### 2. 方法

#### 1) リンパ球の分離

ヒト末梢血よりFicoll-Paque (Pharmacia) により単

核細胞を分離し、さらに、ナイロンウールカラムによりカラム通過細胞およびナイロンウール付着性細胞に分離し、前者をT細胞分画、後者を抗原呈示細胞 (APC) 分画として用いた<sup>5)</sup>。

2) APC 分画の抗原パルス

APC 分画を TG 抗原 (1 μg/ml, 5 μg/ml, 10 μg/ml) およびマイトマイシン C 50 μg/ml とともに 37°C 1 時間培養したのち、PBS で3回洗浄した (TG パルス APC)。対照として TG 抗原パルスしない APC 分画 (マイトマイシン処理のみ) を準備した<sup>5)</sup>。

3) T 細胞による <sup>3</sup>H-TdR の取り込み能の測定

T 細胞 1×10<sup>5</sup> 個を TG 抗原パルスまたは TG 抗原パルスしない自己の APC 1×10<sup>4</sup> 個とともに 200 μl の 10 % ウシ胎児血清加 RPMI 1640 培養液中に浮遊させ、マイクロタイタープレート (Nunc) を用い、37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養器 (NAPCO) で 6 日間培養、回収 16~18 時間前に 0.5 μCi の tritiated thymidine, <sup>3</sup>H-TdR (NEN, MA) を加えた。回収はオートマチックセルハーベスター (Labomash) を用い、<sup>3</sup>H-TdR の取り込みは液体シンチレーションカウンター (Aloka) を用いて測定した。

表 1 TG 抗原パルス APC による T 細胞増殖性反応\*の代表例

Group 1 : 慢性甲状腺炎患者で TgAb 陽性群

Cell Donor (Sex, Age)	TG pulsed			
	—	1 μg/ml	5 μg/ml	10 μg/ml
H. S.** (F. 70)	7,731 ± 1,186	9,386 ± 1,419	8,418 ± 1,577	8,969 ± 778
A. N.** (F. 25)	2,115 ± 105	2,919 ± 91***	2,910 ± 646	2,865 ± 231
K. U. (F. 53)	4,091 ± 907	6,656 ± 125	7,240 ± 693	5,674 ± 504
I. W.** (F. 74)	4,806 ± 19	6,847 ± 599	7,586 ± 11	6,866 ± 795
M. N. (F. 34)	10,565 ± 135	9,057 ± 2,984	11,117 ± 1,379	10,960 ± 2,617

H. S. (TgAb : ×51,200, 罹病期間 2 yrs.) A. N. (×800, 1 Mo.)  
K. U. (×102,400, 3 yrs.) I. W. (×819,200, 4 yrs.) M. N. (×25,600, 1 yr.)

Group 2 : 慢性甲状腺炎患者で TgAb 陰性群

Cell Donor (Sex, Age)	TG pulsed			
	—	1 μg/ml	5 μg/ml	10 μg/ml
N. A. (F. 49)	3,525 ± 538	3,429 ± 397	2,971 ± 190	2,887 ± 453
A. F.** (F. 54)	1,120 ± 113	867 ± 264	694 ± 212	931 ± 311
M. M. (F. 41)	1,156 ± 218	1,218 ± 287	1,196 ± 166	1,181 ± 272
R. K. (F. 15)	5,404 ± 64	8,785 ± 806	7,419 ± 1,012	7,594 ± 34

N. A. (TgAb : negative, 2 yrs.) A. F. (neg., 4 yrs.) M. M. (neg., 2 yrs.)  
R. K. (neg., 2 yrs.)

Group 3 : 健常者で TgAb 陰性群

Cell Donor (Sex Age)	TG pulsed			
	—	1 μg/ml	5 μg/ml	10 μg/ml
M. N. (F. 28)	1,520 ± 97	1,125 ± 220	1,068 ± 217	1,320 ± 253
T. I. (F. 25)	1,558 ± 191	1,468 ± 505	1,725 ± 363	1,202 ± 329
T. M. (F. 30)	913 ± 158	934 ± 69	1,226 ± 215	1,016 ± 47
K. O.** (F. 40)	2,597 ± 295	2,950 ± 224	3,406 ± 503	3,280 ± 263

M. N., T. I., T. M., K. O. (TgAb : negative)

\* 1×10<sup>5</sup> 個の T 細胞をサイログロブリンパルス APC 1×10<sup>4</sup> 個とともに 6 日間培養し、回収 16~18 時間前に <sup>3</sup>H-TdR を加え、トリチウムの取り込みを平均 cpm ± SD で表わした。

\*\* 同一症例につき 2 回以上実験を行いその成績の代表例を示す。

\*\*\* —, ..... はそれぞれ Student の t 検定で p < 0.01, p < 0.05 の危険率を示す。

表 2 慢性甲状腺炎 (CT) 患者および健康人における TG パルス APC による T 細胞増殖性反応

Cell Donor	TgAb	T cell proliferative response		
		positive*	negative	total
CT patient	pos.	4	6	10
	neg.	1	5	6
healthy person	neg.	1	7	8

\* 表 1 に示した有意差検定で  $p < 0.05$  のものを T 細胞-TG パルス APC 反応陽性とした。

なお、培養は triplicate で行った。また、 $^3\text{H-TdR}$  の取り込みは平均  $\text{cpm} \pm \text{SD}$  で表わし、有意差の検定は Student の t 検定による。

### III. 結果

#### (1) CT 患者の T 細胞-APC 間相互作用

表 1 のグループ 1, 2 は、CT 患者でそれぞれ TgAb 陽性、TgAb 陰性を対象として行った TG パルス APC による T 細胞増殖性反応の代表例である。グループ 3 は対照とした TgAb 陰性の健康人について実験を行った結果である。TG パルス APC による T 細胞増殖性反応を惹起させるのに必要な TG の最適濃度は、表 1 に示すように個人差がある。これは患者の性・年齢・TgAb 抗体価・罹病期間などには規定されなかった。しかし、TG  $1 \mu\text{g/ml} \sim 10 \mu\text{g/ml}$  のいずれかの濃度でパルスした場合に T 細胞増殖性反応が起こりやすいことから、 $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$  の 3 濃度で APC のパルスを行った。このようにして行った成績を検討するにあたり、TG パルス APC と非パルス APC を用いた場合の T 細胞による  $^3\text{H-TdR}$  の取り込み (平均  $\text{cpm} \pm \text{SD}$ ) 値に有意差があるかどうかをみるため、Student の t 検定を行い、危険率 5% 以下 ( $p < 0.05$ ) を T 細胞増殖性反応陽性とした。

#### (2) CT 患者および健康人における T 細胞増殖性反応

表 2 は、このようにして得られた結果を、実験を行った全対象についてまとめたものである。CT 患者群における T 細胞増殖性反応陽性率は  $5/16$  で、健康者群の  $1/8$  に比し著明に高いが、そのうち TgAb 陽性者の T 細胞増殖性反応陽性率は  $4/10$  で TgAb 陰性患者の  $1/6$  に比し、明らかに高率であった。以上の結果により、このシステムによる T 細胞の増殖性反応は、CT 患者とくに TgAb 陽性者に比較的特異的に陽性となることが判明し

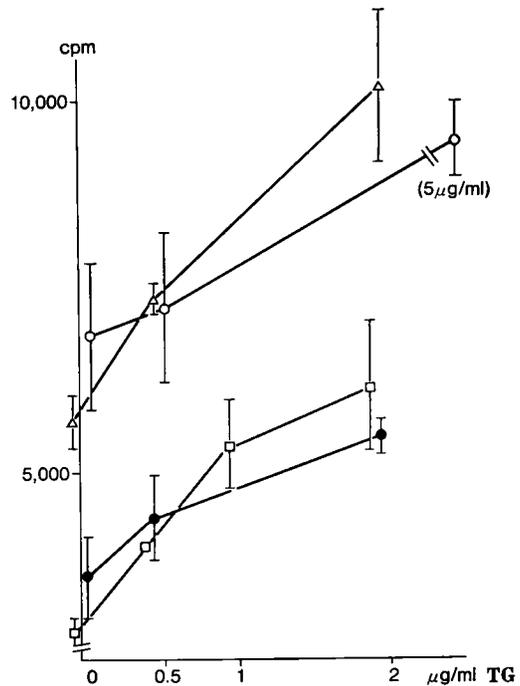


図 1 T 細胞-APC 培養液中に TG が存在する場合の T 細胞増殖性反応 (CT 患者)

△または□: T 細胞-TG パルス APC 反応陽性者 (TgAb 陽性)  
○または●: T 細胞-TG パルス APC 反応陰性者 (TgAb 陰性)

た。

#### (3) TG を培養液中に加えた場合の T 細胞増殖性反応

図 1 に示すように、T 細胞-TG パルス APC のシステムで T 細胞増殖性反応陽性のもは、TG が培養液中に存在する場合にも T 細胞増殖性反応陽性となった。しかし、TgAb 陰性 CT 患者および健康者 (図 2) の一部 (8 例中 4 例) にも T 細胞-TG パルス APC のシステムで T 細胞増殖性反応陰性でありながらこの系では T 細胞増殖性反応が陽性となるものがあつた。

### IV. 考案

本実験における T 細胞-TG パルス APC システムでは、TgAb 陽性 CT 患者は TgAb 陰性 CT 患者や健康者に比べて T 細胞の増殖性反応が高率に陽性となった。一般的に、T 細胞-APC システムで活性化される T 細胞は、マウスでは主として  $\text{Lyt } 1^+$  の細胞であるとされている<sup>9)</sup>。このことからすると、TgAb 陽性 CT 患者では抗サイログロブリン抗体産生にヘルパーあるいはイン

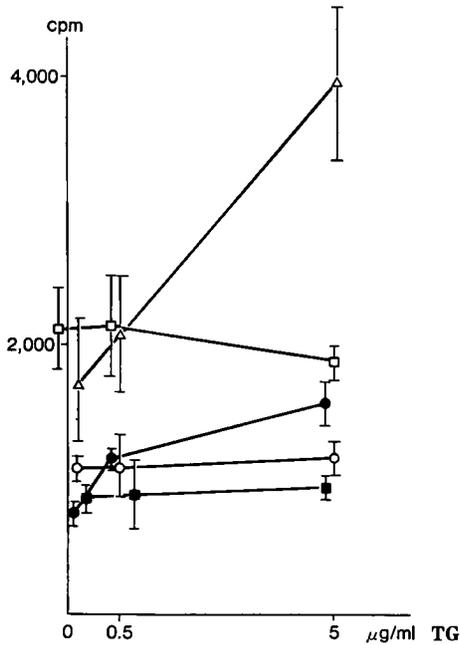


図2 T細胞-APC培養液中にTGが存在する場合のT細胞増殖性反応(健常者)

T細胞-TGパルスAPC反応, TgAbともに陰性.

デューサーとしてはたらく細胞が活性化されやすい状態になっている, と考えられる. しかしながら, TgAb陽性患者においてT細胞-APC反応が必ずしも陽性とならなかった. この理由として, 表1からわかるように, TgAb陽性群はTgAb陰性群および健常者群に比べ

コントロール値が高いことから, TgAbの高い患者では既にTG反応性のT細胞がin vivoで強く活性化していた可能性も考えられる. このため, in vitroでTGパルスしたAPCで刺激した場合に有意差を認めなかったのかもしれない.

次に, 培養液中にTGを加えてT細胞増殖性反応をみた場合には, TgAb陽性患者はTGパルスAPCによるT細胞増殖性反応とほぼ一致したが, TgAb陰性患者あるいは健常者の一部にもT細胞-TGパルスAPC反応陰性でありながらこの系では陽性を呈するものがあり, この活性化されるT細胞はヘルパーT細胞と結びつけて考えることが困難である. この理由として, 1) 培養液中にTGが存在すると, APCでは刺激できなかったある種のT細胞を直接刺激する可能性があること. あるいは, 2) 加えたTGがAPCを介してT細胞を刺激する系と, 1に示したように直接ある種の細胞を刺激する系の両方を同時にみていることも考えられる. とくに抑制性T細胞は直接可溶性抗原を認識するとされていることから<sup>9)</sup>, TgAb陰性群または健常者群において培養液中のTGにT細胞が反応した例ではTgAb産生抑制機能が著明に亢進していたのを反映しているのかもしれない.

以上のように, TgAb産生にはたらくヘルパーT細胞活性化はAPCを介して行われていることが示唆され, TGパルスしたAPCを用いるシステムがCTの解析とくにTgAb産生における調節性T細胞活性化の機構解明に有用であることが判明した. 今後さらに, TGにより増殖性反応を示すT細胞のサブセットを究明することが重要であろう.

## 文 献

- 1) Weigel, W.O.: Analysis of autoimmunity through experimental models of thyroiditis and allergic encephalitis. *Advances in Immunology*, 30: 184-216, 1980.
- 2) 野間 剛・矢田純一・紫芝良昌・小沢安則・稲月文明: 橋本甲状腺炎患者における抗サイログロブリン抗体産生の調節異常について. *アレルギー*, 30: 1132, 1981.
- 3) Salvin, S.B., Sell, S., Nishio, J.: Activity in vitro of lymphocytes and macrophage in delayed hypersensitivity. *J. Immunol.*, 107: 655, 1971.
- 4) Mosier, D.E.: A requirement for two cell types for antibody formation in vitro. *Science*, 151: 1573, 1967.
- 5) Koide, Y., Awashima, F., Akaza, T., Yoshida, T.O.: Human antigen-presenting cells: Characterization of the cells in the T-lymphocyte proliferative response. *Microbiol. Immunol.*, 25: 489, 1981.
- 6) Koide, Y., Awashima, F., Akaza, T., Yoshida, T.O.: Both HLA-DR restricted and nonrestricted functions of adherent cells are required for induction of T-lymphocyte proliferative response. *Human Immunol.*, 3: 313, 1981.
- 7) Van Herle, A.J., Uller, R.P., Matthews, N.L.,

- Brown, J. : Radioimmunoassay for measurement of thyroglobulin in human serum. *J. Clin. Invest.*, 52 : 1320, 1973.
- 8) Corradin, G., Etlinger, H.M., Chiller, J.M. : Lymphocyte specificity to protein antigens. *J. Immunol.*, 199 : 1048, 1977.
- 9) Feldman, M., Kontianen, S. : Suppressor cell induction in vitro. *Eur. J. Immunol.*, 6 : 302, 1976.
-