



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	E-Rosetteの意義, 改良とその応用
Author(s)	小野江, 和則
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 35, 1-7
Issue Date	1975-03
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26488">https://hdl.handle.net/2115/26488</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	35_P1-7.pdf



## E-Rosette の意義, 改良とその応用

小野江和則

(北海道大学免疫科学研究所病理部)

(昭和49年10月19日受付)

### 序

ヒト末梢血中のリンパ球のかかなりの割合が、ヒツジ赤血球 (E) と結合して Rosette (E-R) を形成することは、1970 年前後 Brain ら<sup>2),3)</sup>, Coombs ら<sup>28)</sup> そして Lay ら<sup>1)</sup> によって相ついで報告された。彼らの成績では、末梢リンパ球中 30% 前後が E-R 形成能を有すること、この反応は温度依存性で、リンパ球と赤血球の mixture を最初 37°C で培養、次に 0°C で放置しなければ結合能を表わさないことなどで一致している。また Lay らはブタ赤血球によっても Rosette 形成の起こることを見たが、Nelson らはブタ血球ではほとんど作らないと記しており、現在この Rosette 形成はヒトリンパ球とヒツジ赤血球との間に起こる特有な反応と考えられている。

Brain らはこのように多数のリンパ球がヒツジ赤血球と反応することは、交叉反応を考えにいれても到底理解できる現象ではなく、また血清中の抗ヒツジ赤血球抗体価ともまったく相関を示さないこと、この反応の培養液には血清成分が必要であることなどから Najjar ら<sup>29),30)</sup> の観察、すなわち二つの  $\gamma$ -globulin fraction が赤血球と白血球をおおい、それにより白血球の貪食能が高められること、この作用は Hank's 液で洗うことにより失われるが、適当な  $\gamma$ -globulin を加えることにより回復すること、と本質的に同一の現象と考えた。しかしこの説明によっては理解し難い点が多く、E-R の本態は現在に致るまで不明であり、また人によりその手技に多少のばらつきがあることなどもあって、E-R に関してはその手技改良及び応用面が先行してきた。

### E-R 形成細胞と T cell

ヒトリンパ球の E-R 形成が、さかんに応用されてきた理由は、次の事実から E-R 形成リンパ球が T cell であることが明らかとなってきたためである。

第一に 100% 近い胸腺リンパ球が、E-R 形成能を有すること<sup>1),6),7),20),21)</sup>、第二に PHA 反応性が高いこと<sup>11)</sup>、第三に lymphoid tissue においてはこの細胞は胸腺依存部に限局すること<sup>26),31)</sup>などである。さらに E-R 形成

細胞は細胞表面に IgG, 補体受容体を持たない<sup>4),6),7),16),24)</sup>、しかし胸腺抗原を持つ<sup>17)</sup> などの観察から現在この E-R 形成細胞が T cell であることは定説化されたようである。

またヒツジ赤血球を抗ヒツジ赤血球血清で処理し、さらに C<sub>3</sub> 補体を結合させた補体結合ヒツジ赤血球 (EAC) を用い、補体受容体を持った細胞 (B cell) を検出する EAC-Rosette なる手技が導入されるに及び<sup>13),16),17),22),24),26)</sup> T 及び B cell を Rosette 形成能で区別することが可能となり、これらを用いた結果でも、E-R と EAC-R を同時に行なうと、その割合は両者の合計にはほぼ一致する<sup>15),26)</sup> ことなどからも、E-R 形成細胞すなわち T cell であることが確かめられる。ただし最近 Dickler ら<sup>31)</sup> によれば、T, B 両細胞マーカーを共有するリンパ球が、わずかながらも存在することが報告されている。

EAC-R はヒト以外の哺乳類のリンパ球によっても形成され、また Mendes ら<sup>37)</sup> は zymosan と C<sub>3</sub> を結合させた ZC を血球の代りに用いることにより E-R と ZC-R を識別可能にしたことから分るように、補体を介する結合が明らかである。しかし E-R についてはその結合のメカニズム解明の余地がかなり残っている。このことは後で触れる。

次に E-R の形態学的観察として走査電顕及び透過型電顕による報告に触れる。E-R 形成 T cell は一般に小型で (3~4.5  $\mu$ )、表面はなめらかであり、microvilli は少なく、またあっても短かいものが多く、一方 EAC-R 形成 B cell は大型で (4~8  $\mu$ )、多数の長い microvilli を有しており、おおむね Polliack ら<sup>27)</sup> の “relatively smooth” リンパ球、“villous” リンパ球の表現と一致するようである。しかしこの逆の報告も Kay ら<sup>20)</sup> から出されている。いずれにしても E-R 形成の操作の過程でリンパ球の表面構造に変化が起こる<sup>21)</sup> ことなどから、未だ異論の残るところである。

Peck ら<sup>23)</sup> は同様に走査電顕による観察の結果、E-R の結合は microvilli でのみ行なわれ、EAC-R はより幅広い部分で結合することを報告したが、この点については Kay らも同じ結論を出している。このことは最近渡



表1 AET 処理 SRBC と非処理 SRBC の比較

Peripheral Blood Lymphocytes Donor	E-Rosette (%)	AET treated E-Rosette (%)
9	55	55
11	49	60
11	58	68
16	14	26
20	48	69
26	36	43
26	36	47
27	30	43
27	40	53
27	18	30
28	53	68
30	47	54
31	44	64
32	45	72
32	25	50
37	52	69
38	44	64
39	43	64
Malignant Thymoma Cell	83	94

p .01 で有意の差をもって AET 処理 E-R 値の増加が認められた

有意の差を持って明らかに E-R 率の増加が認められた。しかし採血量の制限などもあり、monocyte の混入などに影響され、Kaplan らのような高値ではなかった。

AET の作用機序は恐らくは細胞膜表面の SH 基に関係すると考えられているが、詳細については未だ明確なる結論は得られていない。われわれはこのように E-R 率が上昇する理由として、未処理ヒツジ赤血球とは反応しないが、AET 処理ヒツジ赤血球と反応する T cell population を想定するよりは、結合力の強度の増加 (界面活性、細胞膜の電荷などの変化による) のために、Rosette 形成の操作によるリンパ球とヒツジ赤血球の解離がおさえられることによるのではないかと考えている。

### E-R 結合のメカニズム

前にも述べたように、E-R 形成がいかなる受容体あるいは力によって結合するのかが解明されていない。従って、今回はこれに対して参考となると思われる成績を羅列するにとどめる。

第1に、細胞は生きていなくてはならない<sup>25)</sup>。第2に E-R には温度依存性がある。第3に血清依存性がある。

第4に抗リンパ球血清 (ALS) によって抑制される<sup>3)</sup>。第5にリンパ球をあらかじめ PHA 又は Con A とともに培養 (30 分) すると増加する<sup>5)</sup>。第6にリンパ球をヒツジ赤血球膜抗原で 37°C 30 分培養すると抑制される。さらに形態学的観点からは、ヒツジ赤血球と結合する部位は microvilli に局在することなどがあげられる。

さらに EDTA, Trypsin<sup>32)</sup> そして sodium iodoacetate による抑制<sup>6)</sup> からこの反応には 2 価イオン、及び glycolytic な系路の必要性が考えられる。

われわれは Boyden<sup>36)</sup>、山中<sup>33)</sup> の方法によりヒツジ赤血球のストローマ、及び可溶性抗原を取り出しこれとリンパ球培養後の Rosette 形成に対する影響を見たが、Gergely とは逆に抑制効果を認めなかった。

### E-Rosette の応用

E-R が比較的容易にヒト T cell の割合を示すということから、その本態は不明のままに現在までに種々の応用がなされてきた。

対象がヒトであるということから、特に臨床面 (すなわち疾病との関係) で興味深い成績が得られているようである。

E-R 率が問題となる疾患としては、リンパ系組織の腫瘍、形成不全、機能不全などがあり、従って自己免疫病、免疫不全、本態不明のいわゆる難病にも応用される。

Lay<sup>1)</sup> は Burkitt lymphoma では 0% であったと報告しており、その他慢性リンパ性白血病では大部分が E-R 率の著明な減少がみられることから、B cell origin であることが確かめられた<sup>4), 11), 27)</sup>。しかし T cell origin のものもわずかながらあること<sup>27)</sup> も分ってきた。Luckasen<sup>8)</sup> は primary immunodeficiency disease を調べ、E-R、及び EAC-R 値は正常であるが、EAC-R 形成リンパ球に機能不全のあることをみた。又 Sarcoidosis で E-R の低下をみた報告もある<sup>4)</sup>。

表2-1 疾患別末梢血中リンパ球の E-R 値の例

Disease	E-Rosette (%)
Normal A	62
Normal B	45
Mycosis fungoides	16
S.L.E.	22
Dermatomyositis	30
Sezary syndrome	10
Malignant thymoma*	94

\* Thymoma の tumor をメッシュで Suspension にしたものを用いた

表 2-2 SLE 患者の E-R 値変動

Disease	Date								
	'74. 6. 11	6. 25	7. 2	7. 10	7. 17	7. 23	8. 6	8. 13	9. 17
S.L.E. (%)	48	41	37	33	9	27	27	33	55

われわれは金子との共同実験で、種々の疾患の患者の末梢リンパ球の E-R を調べてみた。その一部を表 2-1 に示す。

Mycosis fungoides は皮膚科でみられる悪性腫瘍であり、SLE, Dermatomyositis は自己免疫病と考えられている。Sezary syndrome は現在では T cell origin と考えられる異型細胞 (写真 4) の末梢血中出現、皮膚浸潤を特徴とする疾患である。最後の malignant thymoma は、外科的に摘除したものを mesh を通して suspension にし、調べたものである。Mycosis fungoides は悪液質に入ったもので T cell の低下が認められ、SLE, Dermatomyositis でもやや低値をとるようである。Sezary syndrome では Broome<sup>34)</sup> らの成績と逆の結果が出て、著しい低下が認められた。このことについては本年の日本網内系学会総会で報告したので、詳細を省く<sup>35)</sup>。

次に表 2-2 であるが、これは SLE の患者 1 名につき経過を追って調べたものである。中で著しく低値を示した時期はこの患者の増悪期と一致していた。このように E-R 値は病状との関係からみても面白い成績が得られるようで、今後とも例数を重ねることが必要と思われる。

これまで臨床面での E-R の応用に重点を置いてきたが、その他にも T cell, B cell の混合 population から T cell のみをかなりの純度で取り出すことも可能であり<sup>6)</sup>、このように取り出した高純度の T cell を用いた基礎実験も考えられる。

さて免疫学の進歩にともない、その主役となるリンパ球の解明が進み、現在では thymus-derived リンパ球 (T cell) と bone marrow (Bursa-equivalent)-derived リンパ球 (B cell) の存在には異論のないようである。この 2 種のリンパ球を区別するために、マウスにおける  $\theta$  抗原発見後、両細胞に対する種々のマーカーが見い出されてきた。しかしヒトにおける E-R 現象はその発見の端緒において、これまでのマーカーとは幾分異なる意味を持ち、又その本態についても本質的な差が感じられる。ただ E-R 形成細胞と T cell の結びつきといった、多分に偶然性の中から生まれたこの現象は、今までの医学の歩みがそうであったように、その方法の簡便さと結

果の重要性を認識された現在特に臨床方面での応用に有効と信ずる。しかしこの E-R 現象のメカニズム解明は、これからの、われわれに荷せられた課題として、おおいに追求されねばならない。

本稿を終るにあたって、AET を合成して下さった本研究所化学部門の関川勲助教授、並びに臨床例の検査に御協力下さった医学部皮膚科金子史男助手に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Lay, W. H. and Mendes, N. F.: Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes. *Nature*, **203**, 531-532, 1971.
- 2) Brain, P., Gordon J. and Willetts, W. A.: Rosette formation by peripheral lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, **6**, 681-688, 1970.
- 3) Brain, P. and Gordon, J.: Rosette formation by peripheral lymphocytes II. Inhibition of the phenomenon. *Clin. Exp. Immunol.*, **8**, 441-449, 1971.
- 4) Paramichall, M. and Holborow, E. J.: Subpopulations of human peripheral blood lymphocytes distinguished by combined rosette formation and membrane immunofluorescence. *Lancet*, **I**, 65-66, 1972.
- 5) Gergely, P., Szegedi, Gy., Fekete, B., Szabo, G. and Petranyi Gy.: Rosette formation and T cells. *The Lancet*, **II**, 883, 1973.
- 6) Jondal, M., Holm, G. and Wigzell, H.: Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells. *J. Exp. Med.*, **136**, 207-215, 1973.
- 7) Brown, G. and Greaves, M. F.: Cell surface markers for human T and B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **4**, 302-310, 1974.
- 8) Luckasen, J. R., Sabad, A., Gajl-Peczalska, K. J. and Kersy, J. H.: Lymphocytes bearing complement receptors, surface immunoglobulins and sheep erythrocyte receptors in primary immunodeficiency diseases. *Clin. Exp. Immunol.*

- nol., **16**, 535-540, 1974.
- 9) Carosella, E. D., Mochanko, K. and Braun, M.: Rosette-forming T cells in human peripheral blood at different ages. *Cell. Immunol.* **12**, 323-325, 1974.
  - 10) Kaplan, M. E. and Clark, C.: An improved rosetting assay for detection of human T lymphocytes. *J. Immunol. Methods*, **5**, 131-135, 1974.
  - 11) Wybran, J., Chantler, S. and Fudenberg, H. H.: Isolation of normal T cells in chronic lymphatic leukemia. *Lancet*, **I**, 126-129, 1973.
  - 12) 橋 武彦, 吉田明子, 高田 肇: ヒト T, B リンパ球測定用指示細胞の改良. *医学のあゆみ*, **90** (8), 434-435, 昭 49.
  - 13) 矢田純一, 橋 武彦: ヒトリンパ球 subpopulation の分別, ヒツジ赤血球結合性リンパ球と補体結合性リンパ球の証明法. *日本免疫実験操作法*, 473-435, 1972.
  - 14) 辻 公美: 比重遠沈法によるリンパ球の分離, Conray 400-Ficoll 法. *日本免疫実験操作法*, 265-265, 1971.
  - 15) 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. *日本免疫実験操作法*, 683-687, 1971.
  - 16) 矢田純一, 月本一郎, 橋 武彦: ヒトリンパ球の起源による性質の相違に関する研究. —ヒツジ赤血球, IgG 抗体感作ヒツジ赤血球, IgM 抗体感作補体 (C<sub>4</sub>, C<sub>3</sub>) 結合ヒツジ赤血球の結合性を marker として. *医学のあゆみ*, **78** (2), 71-72, 昭 46.
  - 17) 矢田純一, 月本一郎, 橋 武彦: ヒトの胸腺由来リンパ球と非胸腺由来リンパ球の分別. *医学のあゆみ*, **79** (8), 479-480, 昭 46.
  - 18) Keder, E., Landazuri, M. O. and Bonavida, B.: Cellular immunoadsorbents: A simplified technique for separation of lymphoid cell populations. *J. Immunol.*, **112**, 1231-1243, 1974.
  - 19) Zucker-Franklin, D.: The percentage of monocytes among mononuclear cell fractions obtained from normal human blood. *J. Immunol.*, **112**, 234-240, 1974.
  - 20) Kay, M. M., Belohradsky, B., Yee, K., Vogel, J., Butcher, D., Wybran, J. and Fudenberg, H. H.: Cellular interactions: Scanning electron microscopy of human thymus-derived rosette-forming lymphocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **2**, 301-309, 1974.
  - 21) Polliack, A., Fu, S. M., Douglas, S. D., Bentwich, Z., Lampen, N. and Harven, E. D.: Scanning electron microscopy of human lymphocyte-sheep erythrocyte rosettes. *J. Exp. Med.*, **140**, 146-158, 1974.
  - 22) Chen, L. T., Eden, A., Nussenzweig, V. and Weiss, L.: Electron microscopic study of the lymphocytes capable of binding antigen-antibody-complement complexes. *Cell. Immunol.*, **4**, 279-288, 1972.
  - 23) Lin, P. S., Cooper, A. G. and Wortis, H. H.: Scanning electron microscopy of human T-cell and B-cell rosettes. *New Engl. J. Med.*, **289**, 548-551, 1973.
  - 24) Bentwich, Z., Douglas, S. D., Siegal, F. P. and Kunkel, H. G.: Human lymphocyte-sheep erythrocyte rosette formation: Some characteristics of the interaction. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **1**, 511-522, 1973.
  - 25) 渡辺陽之輔: リンパ球の微細構造. —連続切片による T, B 細胞の観察を中心として. *日本電顕学会, 北海道地方会主催特別講演会* (昭 49. 10 札幌).
  - 26) Silveira, N. P. A., Mendes, N. F. and Tolnai, M. E. A.: Tissue localization of two populations of human lymphocytes distinguished by membrane receptors. *J. Immunol.*, **108**, 1456-1460, 1972.
  - 27) Polliack, A., Lampen, N., Clarkson, B. D. and Harven, E. De.: Identification of human B and T lymphocytes by scanning electron microscopy. *J. Exp. Med.*, **138**, 607-624, 1973.
  - 28) Coombs, R. R. A., Gurner, B. W., Wilson, A. B., Hlom, G. and Lindgren, B.: Rosetteformation between human lymphocytes and sheep red cells not involving immunoglobulin receptors. *Int. Arch. Allergy*, **39**, 658-663, 1970.
  - 29) Najjar, V. A., Fidalgo, B. V. and Stitt, E.: The physiological role of the lymphoid system. VII. The disappearance of leukokinin activity following splenectomy. *Biochemistry*, **7**, 2376-2379, 1968.
  - 30) Najjar, V. A., Robinson, J. P., Lawton, A. R. and Fidalgo, B. V.: The physiological role of the lymphoid system, I; An extension of the mechanism of antibody-antigen reaction. *Johns Hopk. Med. J.*, **120**, 63-77, 1967.
  - 31) Dickler, H. B., Adkinson, jun. N. F. and Terry, W. D.: Evidence for individual human peripheral blood lymphocytes bearing both B and T cell markers. *Nature*, **247**, 213-215, 1974.
  - 32) Weiner, M. S., Bianco, C. and Nussenzweig, V.: Enhanced binding of neuraminidase-treated sheep erythrocytes to human T lymphocytes.

- Blood, **42**, 939-946, 1973.
- 33) 山中 樹: 羊赤血球感作家兎の Migration Inhibition Test. 結核の研究, **33**, 18-25, 昭 48.
- 34) Broome, J. D., Zucker-Franklin, D., Weiner, M. S., Bianco, C. and Nussenzweiz, V.: Leukemic cells with membrane properties of thymus-derived (T) lymphocytes in a case of Sezary's syndrome: Morphologic and immunologic studies. Clin. Immunol. Immunopatho., **1**, 319-329, 1973.
- 35) 小野江和則, 金子史男: Sezary syndrome の一例. 日本網内系学会会誌, **14**, 89, 昭 49.
- 36) Boyden, S. V.: Cytophilic antibody in guinea-pigs with delayed-type hypersensitivity. Immunol., **7**, 474-483, 1964.
- 37) Mendes, N. F., Miki, S. S. and Peixinho, Z. F.: Combined detection of human T and B lymphocytes by resette formation with erythrocytes and zymosan-C3 complexes. J. Immunol., **113**, 531-536, 1974.

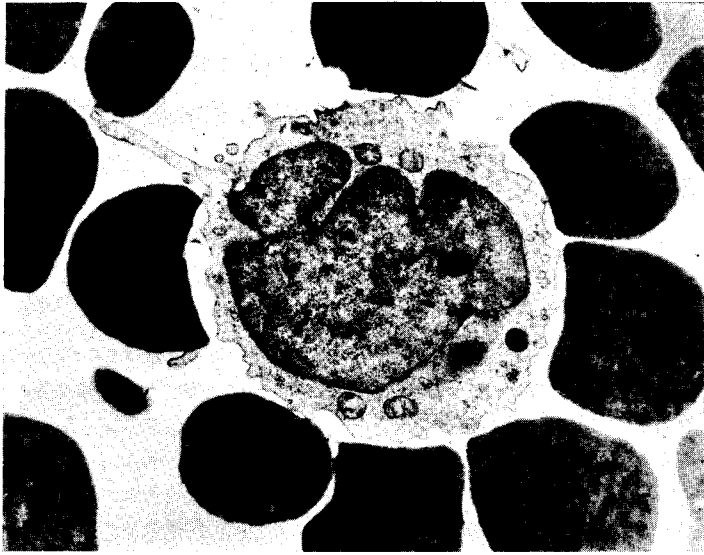


写真1 E-Rosette 形成リンパ球。突起によりヒツジ赤血球 (E) と結合している

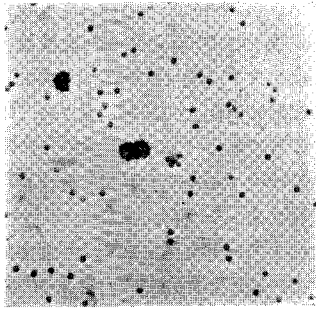


写真2 E-Rosette

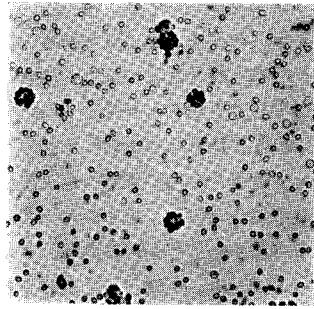


写真3 AET 処理 E-Rosette

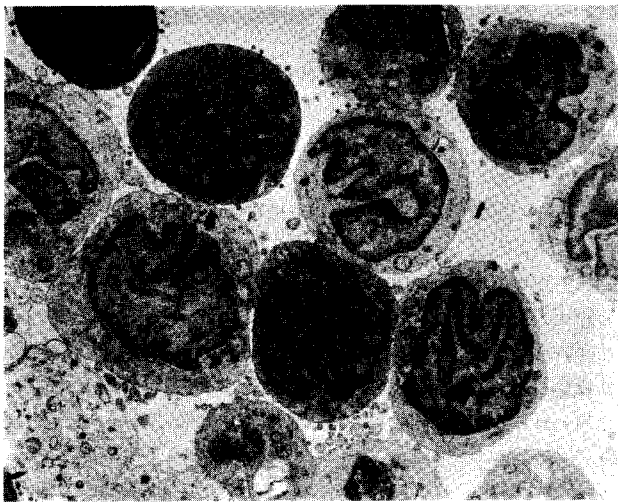


写真4 Sezary Syndrome 患者末梢血中の Sezary cell