

# 原発性シェーグレン症候群における末梢血リンパ球サブセット

奈良県立医科大学第1内科学教室

大楠 皓亮

## LYMPHOCYTE SUBSETS OF PERIPHERAL BLOOD IN PRIMARY SJÖGREN'S SYNDROME

KOHSUKE OHKUS

*The First Department of Internal Medicine, Nara Medical University*

Received July 30, 1991

*Summary*: In order to elucidate the lymphocyte functions in primary Sjögren's syndrome (SS), peripheral blood lymphocyte subsets were investigated, using two-color immunofluorescence with fluorescein isothiocyanate- and phycoerythrin-labeled monoclonal antibodies to human lymphocyte antigens and flow cytometric analysis.

In all of the patients with SS, the CD4/CD8 ratio was not different, but the numbers of CD3+ cells and CD4+ cells were significantly decreased compared with normal controls. In both Group 2, which exhibited globular, cavitory or destructive pattern, but did not receive any prednisolone, and Group 3, which exhibited globular, cavitory or destructive pattern, and received prednisolone, the number of CD8+ cells was significantly decreased compared with normal controls. In both Group 1, which exhibited normal or punctate patterns, and did not receive any prednisolone, and Group 2, the numbers of HLA•DR+ cells, CD16+ cells and Leu7+ cells were not different, but the number of CD20+ cells was significantly decreased compared with normal controls. In all of the patients with SS, the numbers of CD4+Leu8- subsets and CD4+Leu8+ subsets were significantly decreased, but the number of CD8+CD11+ subsets was not different compared with normal controls. In both Groups 2 and 3, the number of CD8+CD11- subsets was significantly decreased compared with normal controls. In all of the patients with SS, the numbers of CD4+HLA•DR+ subsets, CD8+HLA•DR+ subsets, CD16-Leu7+ subsets, CD16+Leu7+ subsets and CD16+Leu7- subsets were not different compared with normal controls. Group 3 demonstrated a significant decrease in CD4/CD8 ratio, but a significant increase in percentages of both CD8+ cells and CD8+CD11+ subsets compared with Group 2.

These findings suggest that abnormalities of helper T cells, suppressor inducer T cells and cytotoxic T cells are found in patients with primary SS, and the decrease in CD4/CD8 ratio due to the elevation of CD8+CD11+ subsets is induced by prednisolone.

### Index Terms

helper T cells, lymphocyte subsets, suppressor inducer T cells, Sjögren's syndrome, two-color flow cytometry

---

緒 言

シェーグレン症候群(SS)は、1933年に Sjögren<sup>1)</sup>によって始めて報告された、涙腺および唾液腺の分泌の減少による乾燥性角結膜炎と口腔乾燥症を主症状とする全身性の慢性炎症性疾患である。本症候群は、1) 各種の自己抗体が血清中に出現すること、2) 細胞性免疫の異常が認められること、3) リンパ球の浸潤が外分泌腺組織中に認められることから、全身の外分泌腺がリンパ球浸潤によって傷害される自己免疫性炎症性疾患と考えられている。また本症候群は、乾燥症状のみを示すもの(原発性 SS)から、慢性関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)、混合性結合組織病などの膠原病や、慢性甲状腺炎、原発性胆汁性肝硬変症などの自己免疫疾患に合併するもの(二次性 SS)を含むものであり、多彩である。

原発性 SS におけるリンパ球機能異常には B 細胞の自己抗体過剰産生<sup>2)</sup>、T 細胞機能の異常<sup>3-11)</sup>、ナチュラルキラー(NK)あるいはキラー細胞機能の低下<sup>12,13)</sup>などが挙げられており、本疾患における外分泌腺の障害は主としてリンパ球全般にわたる機能異常に基づくと考えられている。近年、リンパ球表面抗原と特異的に反応する単クローン抗体と flow cytometry(FCM)を用いることで、末梢血リンパ球サブセットの解析が容易になった。SS についても、リンパ球機能異常をより明確にする目的で、単クローン抗体と FCM を用いた末梢血リンパ球サブセットの解析が進められている。また SS の臨床症状とリンパ球サブセットの変動との関連性も注目されているが、まだその結論が得られるには至ってはいない。その理由としては、1 カラー分析によるリンパ球機能の把握には限界があること、SS が他の自己免疫疾患に合併することが多いこと、さらには治療に使用される副腎皮質ステロイドがリンパ球サブセットに及ぼす影響の大きいこと<sup>14)</sup>などが挙げられる。

最近では、異なる 2 種類の単クローン抗体を組み合わせた 2 カラー分析法が開発されており、機能的リンパ球サブセットの検出が可能になっている。例えば、CD4+ 細胞に属する機能的サブセットであるヘルパー T 細胞

とサブプレッサーインデューサー T 細胞の識別が可能になり<sup>15,16,17)</sup>、リンパ球の動態がより詳細に把握できるようになったといえる。そこで今回著者は、原発性 SS におけるリンパ球機能の異常を究明する目的で、末梢血リンパ球サブセットを FCM による 1 カラー分析および 2 カラー分析で解析した。

対象と方法

1. 対象

対象は、奈良県立医科大学第 1 内科に入院または通院中の患者で、厚生省特定疾患調査研究班の診断基準<sup>18)</sup>を満たし、かつ乾燥症状だけを示す原発性 SS 患者 52 例を選んだ。その性別は男性 2 例、女性 50 例であり、年齢は 41~76 歳(平均 58.0±10.0 歳)であった。

病期別にリンパ球サブセットの検討をするため、耳下腺造影所見によって Rubin & Holt<sup>19)</sup>分類の Stage O~I と、SS に特徴的な所見とされる Stage II~IV の 2 群に分けた。さらに副腎皮質ステロイドがリンパ球サブセットにおよぼす影響をみるため、副腎皮質ステロイド投与の有無による区分を加えて全対象を G1 群(Stage O~I の副腎皮質ステロイド未投与群)16 例、G2 群(Stage II~IV の副腎皮質ステロイド未投与群)23 例、および G3 群(Stage II~IV の副腎皮質ステロイド投与群)13 例の 3 群に分けた(Table 1)。使用した副腎皮質ステロイドは、プレドニソロン(prednisolone; PSL)であり、1 日 10~20 mg が投与されていた(Stage O~I には副腎皮質ステロイド投与例がなかった)。

対照群として、対象の原発性 SS 患者と性別、年齢分布をほぼ一致させた健康成人 17 例を選んだ。その性別は男性 2 例、女性 15 例であり、年齢は 43~76 歳(平均 56.9±10.9 歳)であった(Table 1)。

2. 方法

(1) 1 カラー分析の染色

ヘパリン加末梢血から、Ficoll-Hypaque(Pharmacia 社製)比重遠心法によって末梢血単核細胞(PBMC)を分離した。PBMC に培養液 5 ml を加え、300×g の条件下で 4℃・10 分間遠心した。この操作を 3 回繰り返し

Table 1. Subjects in this study

Subjects	Number	Sex		Age	(Mean±SD)
		(M/F)			
Healthy volunteers	17	(2/15)		43~76	(56.9±10.9)
Group 1 (G1)	16	(0/16)		41~69	(56.8± 8.5)
Group 2 (G2)	23	(1/22)		40~76	(59.4± 9.4)
Group 3 (G3)	13	(1/12)		37~73	(57.1±12.3)

て、PBMCを洗浄した。使用した培養液は0.01 M リン酸緩衝生理食塩水(PBS, 日本製薬社製; pH 7.3)に2% 非働化ウシ胎児血清(FCS, Chimera Biomedics Corporation 製), 0.02% アジ化ナトリウム( $\text{NaN}_3$ , 和光純薬工業社製)を加えて調整したものである。PBMCをこの培養液に浮遊させて、細胞数が $2 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度となるように調整をした。試験管(Falcon 2052)にPBMC  $50 \mu\text{l}$ ( $2 \times 10^7$  個/ml)と fluorescein isothiocyanate (FITC)標識単クローン抗体  $20 \mu\text{l}$ を加えて静かに混和し、氷冷中で遮光して30分間反応させた。対照には単クローン抗体の代わりに培養液  $20 \mu\text{l}$  またはマウス  $\text{IgG}_1$  (Becton Dickinson 社製)  $20 \mu\text{l}$ を加えた。反応後、培養液  $2 \text{ ml}$ を加え、 $300 \times g$ の条件下で $4^\circ\text{C} \cdot 10$ 分間遠心して余剰の抗体を洗浄した。このPBMCのペレットに培養液  $1 \text{ ml}$ を加え、細胞数が $1 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度となるように調整した。この細胞をフローサイトメータ(Becton Dickinson 社製, FACStar)で解析した。

#### (2) 2カラー分析の染色

2カラー分析は、FITCとphycoerythrin(PE)の2色素で標識された抗体の二重染色により、シングルレーザー装置で実施した。つまり1カラー分析の場合と同様に分離したPBMC  $50 \mu\text{l}$ ( $2 \times 10^7/\text{ml}$ )にFITC標識単クローン抗体  $20 \mu\text{l}$ とPE標識単クローン抗体  $20 \mu\text{l}$ を加え、静かに混和し、氷冷中で遮光して30分間反応させた。反応後、培養液  $2 \text{ ml}$ を加え、 $300 \times g$ の条件下で $4^\circ\text{C} \cdot 10$ 分間遠心して先と同様に洗浄した。このPBMCのペレットに培養液  $1 \text{ ml}$ を加えて細胞数が $1 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度となるように調整した。この細胞をFACStarで解析した。

#### (3) フローサイトメータによる解析

FITCとPEの蛍光励起にはレーザー電源(Becton Dickinson 社製, INNOVA 70)によるアルゴンイオンレーザー光( $488 \text{ nm}$ )を使用した。FITCの発する緑色蛍光

( $530 \text{ nm}$ , fluorescence 1), PEの発する赤色蛍光( $585 \text{ nm}$ , fluorescence 2), 前方向スキャッター光(forward scatter), 側方向スキャッター光(side scatter)の4つのパラメータを検出し、コンピュータシステム(Hewlett Packard 社製, CONSORT 30 H-P 310)により解析した。

2カラー分析におけるデータの表示にはdot plotを用い、このサイトグラムからゲート設定により、リンパ球集団だけを取り出した。収集リンパ球数は10,000個とし、それぞれの単クローン抗体陽性細胞数を等高線で表示した。すなわち、2つのパラメータに対する細胞の存在が2次元グラフに等高線で表示され、等高線の分布からリンパ球を4つのサブセットに分けた。なお、フローサイトメータ解析時の細胞の生存率は、トリパンプルー染色法で98%以上であった。

#### (4) 単クローン抗体の特性

今回使用した単クローン抗体の特性をTable 2に示した。このうち、CD3(Leu 4, Becton Dickinson 社製)<sup>20,21</sup>, CD4(Leu 3a, Becton Dickinson 社製)<sup>20,21</sup>, CD8(Leu 2a, Becton Dickinson 社製)<sup>20,21</sup>をT細胞のマーカー、HLA・DR(Becton Dickinson 社製)<sup>22</sup>を活性化T細胞のマーカー、CD20(BI, Coulter 社製)<sup>23</sup>をB細胞のマーカー、Leu 7(Becton Dickinson 社製)<sup>24</sup>, CD16(Leu 11, Becton Dickinson 社製)<sup>25</sup>をNK細胞のマーカーとして1カラー分析に用いた。すなわち、CD3は成熟T細胞、CD4はヘルパー/インデューサーT細胞、CD8はサブプレッサー/細胞障害性T細胞、HLA・DRはB細胞と活性化T細胞、CD20はB細胞、Leu 7はNK細胞と一部のT細胞、CD16はNK細胞のIgG Fc receptorに反応する。

2カラー分析の検討に用いた単クローン抗体の組合せと、そのマーカー機能についてはTable 3に示すように、CD4+Leu 8-細胞はヘルパー機能<sup>16</sup>)を、CD4+

Table 2. Specificity of monoclonal antibodies used in this study

Cluster designation <sup>16)</sup>	Monoclonal antibody	Major specificity	Additional specificity
CD3	Leu 4	Mature T cells	
CD4	Leu 3a	Helper/inducer T cells	Monocytes
CD8	Leu 2a	Cytotoxic/suppressor T cells	NK cells
—	Leu 7	NK cells	Suppressor T cells
—	Leu 8	Some T cells	
CD11	Leu 15	Monocytes and granulocytes	Suppressor T cells and NK cells
CD16	Leu 11	NK cells	Granulocytes
CD20	B 1	B cells	
—	HLA・DR	B cells and activated T cells	Monocytes

Leu 8+細胞はサプレッサーインデューサー機能<sup>17)</sup>を、CD 8+CD 11+細胞はサプレッサー機能<sup>26)</sup>を、CD 8+CD 11-細胞は細胞障害性機能<sup>27)</sup>を表わしている。CD 4+HLA・DR+細胞は活性化された CD 4 陽性 T 細胞<sup>27)</sup>、CD 8+HLA・DR+細胞は活性化された CD 8 陽性 T 細胞<sup>28)</sup>を示している。また NK 細胞のうち、CD 16+Leu 7-細胞が最も強い NK 活性を、CD 16+Leu 7+細胞は中等度の NK 活性を、CD 16-Leu 7+細胞は弱い NK 活性を有している<sup>25)</sup>。

3. 推計学的処理

推計学的処理は、分散分析および多重比較法(Dunnett法)によった。なお本文中の測定値は平均値 ± 標準偏差

で表わした。

成 績

1. 原発性 SS における唾液腺造影所見の進展度と 1 カラー分析による末梢血リンパ球サブセット

(1) 相対比率によるリンパ球サブセットの検討

1) CD 4/CD 8 : まず原発性 SS における唾液腺造影所見と CD 4/CD 8 の関連性について検討した (Table 4)。CD 4/CD 8 は、PSL 未投与で唾液腺造影所見 Stage I の G 1 群で  $1.43 \pm 0.58$ 、Stage II 以上の G 2 群で  $1.86 \pm 0.75$ 、PSL を投与されており唾液腺造影所見 Stage II 以上の G 3 群で  $1.28 \pm 0.43$  であり、どの疾患群も健常対照群 ( $1.79 \pm 0.51$ ) と有意の差を示さなかった。疾患群間の比較では、G 3 群の CD 4/CD 8 が G 2 群に比して有意に低下していた。

2) T 細胞サブセット : CD 3+細胞比率については、健常対照群の  $75.4 \pm 5.2\%$  に比して、G 1 群の  $63.3 \pm 11.4\%$  と G 2 群の  $62.4 \pm 10.0\%$  は有意に低く、G 3 群の  $68.5 \pm 14.3\%$  は有意差を示さなかった。3 疾患群の間には差がなかった (Table 4)。

CD 4+細胞比率は、G 1 群  $36.3 \pm 8.0\%$ 、G 2 群  $37.0 \pm 10.0\%$ 、G 3 群  $34.4 \pm 11.1\%$  であり、どの疾患群も健常対照群の  $47.1 \pm 6.9\%$  に比して有意に低下してい

Table 3. Functional lymphocyte subsets

Monoclonal antibody	Function
CD4+Leu8-	Helper T cells
CD4+Leu8+	Suppressor inducer T cells
CD8+CD11+	Suppressor T cells
CD8+CD11-	Cytotoxic T cells
CD4+HLA・DR+	Activated CD4+cells
CD8+HLA・DR+	Activated CD8+cells
CD16-Leu7+	NK activity (±)
CD16+Leu7+	NK activity (+)
CD16+Leu7-	NK activity (++)

Table 4. CD4/CD8 ratio and percentages of T lymphocyte subsets in patients with primary SS

Subjects	CD4/CD8	CD3+(%)	CD4+(%)	CD8+(%)
Healthy volunteers	$1.79 \pm 0.51$ (n=16)	$75.4 \pm 5.2$ (n=11)	$47.1 \pm 6.9$ (n=17)	$28.1 \pm 6.1$ (n=16)
G 1	$1.43 \pm 0.58$ (n=14)	$63.3 \pm 11.4^{**}$ (n=16)	$36.3 \pm 8.0^{**}$ (n=16)	$27.1 \pm 6.7$ (n=14)
G 2	$1.86 \pm 0.75$ (n=19) **	$62.4 \pm 10.0^{**}$ (n=20)	$37.0 \pm 10.0^{**}$ (n=22)	$22.0 \pm 7.5^{**}$ (n=19)
G 3	$1.28 \pm 0.43$ (n=11)	$68.5 \pm 14.3$ (n=12)	$34.4 \pm 11.1^{**}$ (n=13)	$28.5 \pm 9.1$ (n=11)

Mean±SD, \*\*p<0.01

Table 5. Percentages of activated T cells, B cells and NK cells in patients with primary SS

Subjects	HLA・DR+(%)	CD20+(%)	Leu7+(%)	CD16+(%)
Healthy volunteers	$13.4 \pm 6.9$ (n=11)	$10.1 \pm 2.9$ (n=10)	$15.3 \pm 5.6$ (n=17)	$7.5 \pm 2.6$ (n=16)
G 1	$14.0 \pm 4.6$ (n=16)	$8.5 \pm 3.3$ (n=14)	$27.6 \pm 9.8^{**}$ (n=16)	$14.1 \pm 8.7^{**}$ (n=16)
G 2	$18.8 \pm 5.7$ (n=23)	$9.6 \pm 4.8$ (n=19)	$30.6 \pm 10.4^{**}$ (n=22)	$14.8 \pm 8.3^{**}$ (n=22)
G 3	$14.6 \pm 4.9$ (n=12)	$7.2 \pm 5.1$ (n=11)	$28.9 \pm 9.8^{**}$ (n=13)	$17.7 \pm 12.4^{**}$ (n=13)

\*\*p<0.01

た。3 疾患群の間には差がなかった (Table 4)。

CD8+ 細胞比率は、健常対照群の 28.1±6.1% に比して、G2 群の 22.0±7.5% は有意に低く、G1 群の 27.1±6.7% と G3 群の 28.5±9.1% は有意差を示さなかった。疾患群間の比較では、G3 群の CD8+ 細胞比率が G2 群に比して有意に上昇していた (Table 4)。

3) 活性化 T 細胞 : HLA・DR+ 細胞比率については、健常対照群に比して、どの疾患群も有意差を示さず、3 疾患群の間には差がなかった (Table 5)。

4) B 細胞 : CD20+ 細胞比率は、健常対照群に比して、どの疾患群も有意差を示さず、3 疾患群の間にも差がなかった (Table 5)。

5) NK 細胞 : Leu7+ 細胞比率は、G1 群 27.6±9.8%、G2 群 30.6±10.4%、G3 群 28.9±9.8% であり、どの疾患群も健常対照群の 15.3±5.6% に比して有意に上昇していた。3 疾患群の間には差がなかった (Table 5)。

CD16+ 細胞比率は、G1 群 14.1±8.7%、G2 群 14.8±8.3%、G3 群 17.7±12.4% であり、どの疾患群も健常対照群の 7.5±2.6% に比して有意に上昇していた。3 疾患群の間には差がなかった (Table 5)。

(2) 実数値によるリンパ球サブセットの検討

つぎに、これらのリンパ球サブセットの実数値につい

て検討した。実数値は、同一検体から末梢血リンパ球数を数え、これに各リンパ球サブセットの比率を乗じて算出した。

1) T 細胞サブセット : リンパ球数については、健常対照群の 2,296±429/μl に比して、G2 群の 1,503±540/μl と G3 群の 1,235±501/μl は有意に少なく、G1 群の 1,799±427/μl は有意差を示さなかった。3 疾患群の間には差がなかった (Table 6)。

CD3+ 細胞数は、G1 群 1,132±296/μl、G2 群 953±429/μl、G3 群 817±407/μl であり、どの疾患群も健常対照群の 1,654±343/μl に比して有意に減少していた。3 疾患群の間には差がなかった (Table 6)。

CD4+ 細胞数は、G1 群 649±194/μl、G2 群 526±265/μl、G3 群 446±234/μl であり、どの疾患群も健常対照群の 1,070±234/μl に比して有意に減少していた。3 疾患群の間には差がなかった (Table 6)。

CD8+ 細胞数については、健常対照群の 660±229/μl に比して、G2 群の 336±193/μl と G3 群の 344±139/μl は有意に少なく、G1 群の 499±213/μl は有意差を示さなかった。3 疾患群の間には差がなかった (Table 6)。

2) 活性化 T 細胞 : 原発性 SS の HLA・DR+ 細胞数については、健常対照群の 359±172/μl に比して、G3

Table 6. Absolute numbers of T lymphocyte subsets in patients with primary SS

Subjects	Lymphocytes (/μl)	CD3+ (/μl)	CD4+ (/μl)	CD8+ (/μl)
Healthy volunteers	2,296±429 (n=17)	1,654±343 (n=11)	1,070±234 (n=17)	660±229 (n=16)
G 1	1,799±427 (n=16)	1,132±296** (n=16)	649±194** (n=16)	499±213 (n=14)
G 2	1,503±540** (n=22)	953±429** (n=20)	526±265** (n=22)	336±193** (n=19)
G 3	1,235±501** (n=13)	817±407** (n=12)	446±234** (n=13)	344±139** (n=11)

\*\*p<0.01

Table 7. Absolute numbers of activated T cells, B cells and NK cells in patients with primary SS

Subjects	HLA・DR+ (/μl)	CD20+ (/μl)	Leu7+ (/μl)	CD16+ (/μl)
Healthy volunteers	359±172 (n=11)	244±93 (n=10)	347±128 (n=17)	166±48 (n=16)
G 1	259±135 (n=16)	150±59** (n=14)	500±226 (n=16)	250±154 (n=16)
G 2	283±128 (n=22)	144±80** (n=18)	465±234 (n=22)	225±162 (n=22)
G 3	190±116** (n=12)	90±79** (n=11)	350±167 (n=13)	198±157 (n=13)

\*\*p<0.01

群の  $190 \pm 116 / \mu l$  は有意に少なく, G1 群の  $259 \pm 135 / \mu l$  と G2 群の  $283 \pm 128 / \mu l$  は有意差を示さなかった. 3 疾患群の間には差がなかった (Table 7).

3) B 細胞: CD 20+ 細胞数は, G1 群  $150 \pm 59 / \mu l$ , G2 群  $144 \pm 80 / \mu l$ , G3 群  $90 \pm 79 / \mu l$  であり, どの疾患群も健常対照群の  $244 \pm 93 / \mu l$  に比して有意に減少していた. 3 疾患群の間には差がなかった (Table 7).

4) NK 細胞: Leu 7+ 細胞数と CD 16+ 細胞数の両サブセットについては, 健常対照群に比して, どの疾患群も有意の差を示さず, 3 疾患群の間には差がなかった (Table 7).

2. 原発性 SS における唾液腺造影所見の進展度と 2 カラー分析による末梢血リンパ球サブセット

(1) 相対比率によるリンパ球サブセットの検討

1) CD 4+Leu 8- 細胞: 原発性 SS の CD 4+Leu 8- 細胞比率は, G1 群  $6.7 \pm 2.7 \%$ , G2 群  $9.3 \pm 4.6 \%$ , G3 群  $9.7 \pm 7.5 \%$  であり, どの疾患群も健常対照群の  $14.0 \pm 3.1 \%$  に比して有意に低下していた. 3 疾患群の間には差がなかった (Table 8).

2) CD 4+Leu 8+ 細胞: CD 4+Leu 8+ 細胞比率については, 健常対照群に比して, どの疾患群も有意の差を示さず, 3 疾患群の間にも差がなかった (Table 8).

3) CD 8+CD 11+細胞: CD 8+CD 11+細胞比率は, 健常対照群の  $4.9 \pm 2.2 \%$  に比して, G3 群の  $13.3 \pm 12.7 \%$  は有意に上昇し, G1 群の  $7.3 \pm 3.7 \%$  と G2

群の  $6.4 \pm 3.5 \%$  は有意差を示さなかった. 疾患群間の比較では, G3 群の CD 8+CD 11+ 細胞比率は G1 群と G2 群に比して有意に上昇していた (Table 8).

4) CD 8+CD 11- 細胞: CD 8+CD 11- 細胞比率については, 健常対照群の  $23.3 \pm 5.0 \%$  に比して, G2 群の  $14.7 \pm 8.1 \%$  と G3 群の  $15.2 \pm 9.4 \%$  は有意に低く, G1 群の  $19.8 \pm 5.9 \%$  は有意差を示さなかった. 3 疾患群の間には差がなかった (Table 8).

5) CD 4+HLA・DR+細胞と CD 8+HLA・DR+細胞: CD 4+HLA・DR+ 細胞比率は, 健常対照群の  $1.0 \pm 1.4 \%$  に比して, G2 群の  $3.7 \pm 2.5 \%$  は有意に上昇し, G1 群の  $2.3 \pm 1.1 \%$  と G3 群の  $2.6 \pm 1.6 \%$  は有意差を示さなかった. 疾患群間の比較では, G2 群の CD 4+HLA・DR+ 細胞比率は G3 群に比して有意に上昇していた (Table 9).

CD 8+HLA・DR+ 細胞比率は, 健常対照群の  $1.8 \pm 0.9 \%$  に比して, G2 群の  $6.4 \pm 3.8 \%$  と G3 群の  $5.5 \pm 3.0 \%$  は有意に上昇し, G1 群の  $4.3 \pm 2.9 \%$  は有意差を示さなかった. 3 疾患群の間には差がなかった (Table 9).

6) NK 細胞サブセット: CD 16-Leu 7+ 細胞比率は, 健常対照群の  $11.5 \pm 5.2 \%$  に比して, G1 群の  $18.5 \pm 9.9 \%$  と G2 群の  $21.0 \pm 11.7 \%$  は有意に上昇し, G3 群の  $16.0 \pm 7.3 \%$  は有意差を示さなかった. 3 疾患群の間にも差がなかった (Table 10).

Table 8. Percentages of CD4 lymphocyte subsets and CD8 lymphocyte subsets in patients with primary SS

Subjects	CD4+Leu8-(%)	CD4+Leu8+(%)	CD8+CD11+(%)	CD8+CD11-(%)
Healthy volunteers	$14.0 \pm 3.1$ (n=17)	$33.1 \pm 6.0$ (n=17)	$4.9 \pm 2.2$ (n=16)	$23.3 \pm 5.0$ (n=16)
G 1	$6.7 \pm 2.7^{**}$ (n=16)	$29.6 \pm 8.5$ (n=16)	$7.3 \pm 3.7$ (n=14)	$19.8 \pm 5.9$ (n=14)
G 2	$9.3 \pm 4.6^{**}$ (n=22)	$27.7 \pm 11.7$ (n=22)	$6.4 \pm 3.5$ (n=16)	$14.7 \pm 8.1^{**}$ (n=16)
G 3	$9.7 \pm 7.5^{**}$ (n=13)	$24.7 \pm 10.9$ (n=13)	$13.3 \pm 12.7^{**}$ (n=11)	$15.2 \pm 9.4^{**}$ (n=11)

\*\*p<0.01

Table 9. Percentages of activated T cells in patients with primary SS

Subjects	CD4+HLA・DR+ (%)	CD8+HLA・DR+ (%)
Healthy volunteers	$1.0 \pm 1.4$ (n=13)	$1.8 \pm 0.9$ (n=14)
G 1	$2.3 \pm 1.1$ (n=14)	$4.3 \pm 2.9$ (n=16)
G 2	$3.7 \pm 2.5^{**}$ (n=21)	$6.4 \pm 3.8^{**}$ (n=23)
G 3	$2.6 \pm 1.6$ (n=8)	$5.5 \pm 3.0^{**}$ (n=12)

\*\*p<0.01

CD 16+Leu 7+ 細胞比率は, G 1 群  $9.1 \pm 6.5 \%$ , G 2 群  $9.7 \pm 6.6 \%$ , G 3 群  $12.8 \pm 10.8 \%$  であり, どの疾患群も健常対照群の  $3.8 \pm 1.4 \%$  に比して有意に上昇していた. 3 疾患群の間には差がなかった (Table 10).

CD 16+Leu 7- 細胞比率については, どの疾患群も健常対照群と有意差を示さなかった. 3 疾患群の間にも差がなかった (Table 10).

(2) 実数値によるリンパ球サブセットの検討

1) CD 4+Leu 8- 細胞: 原発性 SS の CD 4+Leu 8- 細胞数は, G 1 群  $120 \pm 51 / \mu\text{l}$ , G 2 群  $143 \pm 107 / \mu\text{l}$ , G 3 群  $125 \pm 120 / \mu\text{l}$  であり, どの疾患群も健常対照群の  $319 \pm 86 / \mu\text{l}$  に比して有意に減少していた. 3 疾患群の間には差がなかった (Table 11).

2) CD 4+Leu 8+ 細胞: CD 4+Leu 8+ 細胞数は, G 1 群  $530 \pm 187 / \mu\text{l}$ , G 2 群  $429 \pm 265 / \mu\text{l}$ , G 3 群  $321 \pm 217 / \mu\text{l}$  であり, どの疾患群も健常対照群の  $769 \pm 193 / \mu\text{l}$  に比して有意に減少していた. 3 疾患群の間には差がなかった (Table 11).

3) CD 8+CD 11+ 細胞: CD 8+CD 11+ 細胞数については, どの疾患群も健常対照群と有意の差を示さず, 3 疾患群の間には差がなかった (Table 11).

4) CD 8+CD 11- 細胞: CD 8+CD 11- 細胞数については, 健常対照群の  $547 \pm 187 / \mu\text{l}$  に比して, G 2 群の  $231 \pm 169 / \mu\text{l}$  と G 3 群の  $208 \pm 169 / \mu\text{l}$  は有意に少なく, G 1 群の  $370 \pm 188 / \mu\text{l}$  は有意差を示さなかった. 3 疾患群の間にも差がなかった (Table 11).

5) CD 4+HLA・DR+ 細胞と CD 8+HLA・DR+ 細胞: CD 4+HLA・DR+ 細胞数と CD 8+HLA・DR+ 細胞数については, どの疾患群も健常対照群と有意差を示さず, 3 疾患群の間には差がなかった (Table 12).

Table 10. Percentages of NK cells in patients with primary SS

Subjects	CD16-Leu7+(%)	CD16+Leu7+(%)	CD16+Leu7-(%)
Healthy volunteers	$11.5 \pm 5.2$ (n=17)	$3.8 \pm 1.4$ (n=17)	$3.7 \pm 1.5$ (n=17)
G 1	$18.5 \pm 9.9^{**}$ (n=16)	$9.1 \pm 6.5^{**}$ (n=16)	$5.0 \pm 2.9$ (n=16)
G 2	$21.0 \pm 11.7^{**}$ (n=22)	$9.7 \pm 6.6^{**}$ (n=22)	$5.1 \pm 2.6$ (n=22)
G 3	$16.0 \pm 7.3$ (n=13)	$12.8 \pm 10.8^{**}$ (n=13)	$4.9 \pm 3.7$ (n=13)

\*\*p<0.01

Table 11. Absolute numbers CD4 lymphocyte subsets and CD8 lymphocyte subsets in patients with primary SS

Subjects	CD4+Leu8-(/μl)	CD4+Leu8+(/μl)	CD8+CD11+(/μl)	CD8+CD11-(/μl)
Healthy volunteers	$319 \pm 86$ (n=17)	$769 \pm 193$ (n=17)	$115 \pm 58$ (n=16)	$547 \pm 187$ (n=16)
G 1	$120 \pm 51^{**}$ (n=16)	$530 \pm 187^{**}$ (n=16)	$129 \pm 67$ (n=14)	$370 \pm 188$ (n=14)
G 2	$143 \pm 107^{**}$ (n=22)	$429 \pm 265^{**}$ (n=22)	$94 \pm 58$ (n=16)	$231 \pm 169^{**}$ (n=16)
G 3	$125 \pm 120^{**}$ (n=13)	$321 \pm 217^{**}$ (n=13)	$136 \pm 115$ (n=11)	$208 \pm 169^{**}$ (n=11)

\*\*p<0.01

Table 12. Absolute numbers of activated T cells in patients with primary SS

Subjects	CD4+HLA・DR+(/μl)	CD8+HLA・DR+(/μl)
Healthy volunteers	$22 \pm 27$ (n=13)	$40 \pm 18$ (n=14)
G 1	$41 \pm 26$ (n=14)	$83 \pm 83$ (n=16)
G 2	$57 \pm 59$ (n=20)	$98 \pm 62$ (n=22)
G 3	$32 \pm 21$ (n= 8)	$71 \pm 43$ (n=12)

\*\*p<0.01

6) NK 細胞サブセット：CD16-Leu7+ 細胞数, CD16+Leu7+ 細胞数および CD16+Leu7- 細胞数については, どの疾患群も健常対照群と有意の差を示さず, 3 疾患群の間には差がなかった(Table 13).

考 察

1. 原発性 SS における唾液腺造影所見の進展度と T 細胞サブセット

(1) 1 カラー分析による T 細胞サブセット

1) CD4/CD8: CD4/CD8 が T 細胞サブセットの相対的变化を把握する指標として有用であることはすでに知られており, 自己免疫疾患と CD4/CD8 の関連について検討が進められてきた. 従来の検討では, SS における CD4/CD8 は健常成人と差を示さなかった<sup>3-9)</sup>とする報告が多い. Ichikawa et al.<sup>9)</sup>は, PSL 未投与の原発性 SS 例では健常成人と差を示さないが, PSL 投与例においては CD4/CD8 の低下が認められたと報告している. 一方で, 健常成人において CD4/CD8 は PSL 投与により低下<sup>14)</sup>することが知られている. つまり, SS 症例におけるリンパ球サブセットは, 疾患自体による CD4/CD8 の変動に加え, PSL 投与による低下も考慮して検討する必要がある. そこで今回著者は, 原発性 SS 患者を Rubin & Holt による唾液腺造影所見の分類<sup>19)</sup>と PSL 投与の有無から対象患者を, PSL 未投与で Stage I の唾液腺造影所見を示す G1 群, PSL 未投与で Stage II 以上の G2 群, PSL 投与中で Stage II 以上の G3 群の 3 群に分類して検討を加えた.

今回の成績では, CD4/CD8 は, 唾液腺造影所見や PSL 投与の有無と関係なく, いずれの疾患群も健常成人と差を示さなかった(Table 14). また疾患群間の検討で

は, G1 群と G2 群間には差がみられなかった. つまり, CD4/CD8 は SS の唾液腺造影所見の進展度指標として用いるには不向きといえる. 一方, G3 群の CD4/CD8 は, G2 群に比して有意に低下していた. つまり, CD4/CD8 は健常人におけると同様に原発性 SS においても, PSL 治療によって低下するといえる.

2) T 細胞サブセット: SS における T 細胞サブセットについては, CD3+ 細胞(Mature T cells)は健常人に比して減少<sup>3,5,8,9)</sup>, CD3+ 細胞は不変<sup>4,7)</sup>, CD4+ 細胞(Helper/inducer T cells)は減少<sup>6,9)</sup>, CD4+ 細胞は不変<sup>3-5,10)</sup>, CD8+ 細胞(Cytotoxic/suppressor T cells)は減少<sup>5,8-11)</sup>, CD8+ 細胞は不変<sup>3,4,6)</sup>, CD8+ 細胞は増加<sup>28)</sup>しているなど, 報告によって相違があり, いまだ一定した結論が得られていない.

今回の検討では, CD3+ 細胞比率は健常対照群に比して PSL 未投与の G1 群と G2 群では有意に低下していたが, PSL 投与の G3 群は健常対照群と差を示さなかった. CD4+ 細胞比率は, 唾液腺造影所見や PSL 投与の有無と関係なく, 健常対照群に比してすべての疾患群において有意に低下していた. また CD8+ 細胞比率については, G2 群が健常対照群に比して有意の低下を示したが, G1 群と G3 群はともに健常対照群と差を示さなかった. 一方, PSL 投与の G3 群における CD8+ 細胞比率は PSL 未投与の G2 群に比して有意に上昇していた. したがって, G3 群における CD4/CD8 が G2 群に比して有意に低下した理由としては, PSL 投与による CD8+ 細胞比率の相対的上昇が考えられる.

次に T 細胞サブセットを実数値で検討した. SS の末梢血リンパ球数については減少しているという報告<sup>3,5,9,10)</sup>が多い. 今回の成績では, 末梢血リンパ球数は健

Table 13. Absolute numbers of NK cell subsets in patients with primary SS

Subjects	CD16-Leu7+(/μl)	CD16+Leu7+(/μl)	CD16+Leu7-(/μl)
Healthy volunteers	262±123 (n=17)	85±27 (n=17)	81±27 (n=17)
G 1	340±222 (n=16)	160±112 (n=16)	90±54 (n=16)
G 2	315±213 (n=22)	150±135 (n=22)	75±39 (n=22)
G 3	208±153 (n=13)	143±125 (n=13)	55±47 (n=13)

\*\*p<0.01

Table 14. Summary of T lymphocyte subsets in patients with primary SS

subjects	CD3+		CD4+		CD8+		CD4/CD8
	%	Number	%	Number	%	Number	
G 1	↓	↓	↓	↓	→	→	→
G 2	↓	↓	↓	↓	↓	↓	→
G 3	→	↓	↓	↓	→	↓	→



常対照群に比して G2 群と G3 群で有意に減少していたが、G1 群では健常対照群と差を示さなかった。CD3+細胞数と CD4+細胞数は、すべての疾患群において健常対照群に比して有意に減少していた。CD8+細胞数は、健常対照群に比して G2 群と G3 群で有意に減少していたが、G1 群では減少傾向を示すにとどまっていた。つまり、唾液腺造影所見 Stage II 以上の SS における CD3+細胞数、CD4+細胞数および CD8+細胞数は健常対照群に比して有意に減少しているものであり、原発性 SS の唾液腺造影所見の進展に各 T 細胞サブセットが関与している可能性がうかがわれる。

3) 活性化 T 細胞: SS の活性化 T 細胞についても従来の報告では、不変<sup>4,29)</sup>であったとするものや、増加<sup>3,6,30-32)</sup>していたとするものが混在している。今回の HLA・DR+細胞(活性化 T 細胞と B 細胞)比率についての検討では、すべての疾患群は健常対照群と差を示さなかった。一方、HLA・DR+細胞数については、G1 群と G2 群は健常対照群と差を示さなかったが、G3 群が健常対照群に比して有意の減少を示した。つまり、リンパ球数および T 細胞数が減少を示したにもかかわらず、G1 群と G2 群における HLA・DR+細胞が相対比率の低下のみならず、その細胞数も減少しなかった今回の成績は注目に値する。

CD20+細胞(B細胞)比率は、すべての疾患群において健常対照群と差を示さなかった。一方、CD20+細胞数は、すべての疾患群において健常対照群に比して有意に減少していた。つまり、PSL 未投与の G1 群と G2 群における CD20+細胞数は健常対照群に比して有意に減少していたにもかかわらず、HLA・DR+細胞数が減少していないことが今回の検討から明らかとなった。したがって、今回の成績は、原発性 SS においては活性化 T 細胞数が増加していることを示唆している。しかし、HLA・DR+細胞数は、疾患群間に差を示さなかったもので、SS における唾液腺造影所見の進展と関連を示さないといえる。

4) 小括: 1 カラー分析についての今回の成績は、SS におけるリンパ球数と各 T 細胞サブセットの細胞数の

減少、さらに唾液腺造影所見の進展とともにその両者により減少する傾向を明らかにした。また PSL 治療による CD4/CD8 の低下は CD8+細胞比率の相対的上昇に起因することも明らかになった。しかし、G3 群における CD3+細胞や CD8+細胞のように、相対比率のみでは T 細胞比率の低下が明瞭ではないサブセットも存在した。したがって、原発性 SS のリンパ球サブセットの変動を正確に把握するには相対比率の検討に加えて実数値による検討が不可欠と考えられる。

(2) 2 カラー分析による T 細胞サブセット

前述の 1 カラー分析で判明した各 T 細胞サブセットにおける細胞数の減少や CD4/CD8 の低下は、いかなる T 細胞の機能的変動を意味するのか、さらにはいかなる免疫学的意義を示すかについて明らかにされていない。一方では、Leu3a(OKT4 または T4)抗体が反応する CD4 抗原は class II MHC 分子、Leu2a(OKT8 または T8)抗体が反応する CD8 抗原は class I MHC 分子に対するレセプターであることが判明している<sup>33,34)</sup>。しかし、これらの単クローン抗体が反応する抗原は、T 細胞の分化抗原であるが、T 細胞の機能的マーカーにはならない。したがって、T 細胞機能をよりの確に反映する手段が必要になる。そこで今回著者は、原発性 SS における機能的リンパ球サブセットを解明する目的で、FCM による 2 カラー分析を実施した。

1) CD4+Leu8-細胞: SS における CD4+Leu8-細胞(ヘルパー T 細胞)について、従来の報告<sup>3,5)</sup>はその相対比率が健常成人と差を示さないという。しかし今回の著者の成績では、CD4+Leu8-細胞比率は健常対照群に比してすべての疾患群において有意に減少しており、CD4+Leu8-細胞数もすべての疾患群において有意に減少していた(Table 15)。

Mosmann et al.<sup>35)</sup>は、ヘルパー T 細胞をタイプ 1 とタイプ 2 の 2 種類に分類できると報告しており、タイプ 1 がインターロイキン 2(IL-2)<sup>36)</sup>、インターロイキン 3(IL-3)<sup>37)</sup>、 $\gamma$ インターフェロン(IFN- $\gamma$ )<sup>38)</sup>や顆粒球・マクロファージコロニー形成刺激因子(GM-CSF)<sup>39)</sup>を産生、タイプ 2 がインターロイキン 4(IL-4)<sup>40)</sup>、インターロイ

Table 15. Summary of CD4+ lymphocyte subsets and CD8+ lymphocyte subsets in patients with primary SS

subjects	CD4+Leu8-		CD4+Leu8+		CD8+CD11+		CD8+CD11-	
	%	Number	%	Number	%	Number	%	Number
G 1	↓	↓	→	↓	→	→	→	→
G 2	↓	↓	→	↓	→	→	↓	↓
G 3	↓	↓	→	↓	↑	→	↓	↓

キン5(IL-5)<sup>41)</sup>, IL-3 や GM-CSF を産生するという。また従来の報告<sup>12,31,42)</sup>によると, SS 患者の末梢血リンパ球における IL-2, IFN- $\gamma$  および IFN- $\alpha$  産生能は低下しており, この低下が原発性 SS をはじめとする自己免疫疾患における NK 細胞活性低下に関係しているものと考えられている。今回の CD 4+Leu 8- 細胞数の減少は, 原発性 SS における IL-2, IFN- $\gamma$  や IFN- $\alpha$  産生能が低下しているという事実を裏づけるものと思われ, 前述したリンホカイン産生能低下の原因と考えられる。このリンホカイン産生能の低下が, 対応するリンホカイン生物活性を低下させるために, 結果として抗体産生調整機構が破綻することになる。この機序が原発性 SS における多彩な自己抗体の出現に関与しているものと推測される。

2) CD 4+Leu 8+ 細胞: SS における CD 4+Leu 8+ 細胞(サブプレッサーインデューサー T 細胞)比率についても, 低下していたとの報告<sup>6,29)</sup>と不変であったという報告<sup>3)</sup>が混在しており, 意見の一致がみられない。著者の成績では, CD 4+Leu 8+ 細胞比率はすべての疾患群において健常対照群と差を示さなかったが, CD 4+Leu 8+ 細胞数はすべての疾患群において有意に減少していた。この CD 4+Leu 8+ 細胞は, alloantigen に対する mixed lymphocyte reaction (MLR) において CD 8+ 細胞のサブプレッサー機能を誘導するとされている<sup>17)</sup>。したがって, 原発性 SS における CD 4+Leu 8+ 細胞数の減少は, サブプレッサーインデューサー T 細胞, サブプレッサーアクセプター T 細胞, サブプレッサーエフェクター T 細胞を介して B 細胞の抗体産生を抑制する抑制性回路の機能低下を招来し, B 細胞における免疫グロブリン産生過剰を惹起するものと推測される。

3) CD 8+CD 11+ 細胞: CD 8+CD 11+ 細胞(サブプレッサー T 細胞)比率は, 健常対照群に比して不変<sup>2,3,6)</sup>であるが, PSL 投与によって上昇<sup>3)</sup>するとされている。今回の著者の成績では, CD 8+CD 11+ 細胞比率は, PSL 未投与の G 1 群と G 2 群において健常対照群と差を示さなかったが, 健常対照群と PSL 未投与群に比して PSL 投与の G 3 群で有意に増加していた。一方, CD 8+CD 11+ 細胞数は, すべての疾患群において健常対照群と有意差を示さなかった。つまり, CD 8+CD 11+ 細胞比率は, 原発性 SS の唾液腺造影所見の進展に関与していないのであり, 唾液腺造影所見の指標にはならないことになる。

4) CD 8+CD 11- 細胞: Clement et al.<sup>27)</sup>は, alloantigen を用いた検討から, CD 8+CD 11- 細胞(細胞障害性 T 細胞)が細胞性細胞障害作用(CMC)を有して

いると報告している。従来の報告では, PSL 未投与の原発性 SS は CD 8+CD 11- 細胞比率の低下<sup>3)</sup>を示したという。今回の成績では, CD 8+CD 11- 細胞比率は, 健常対照群に比して唾液腺造影所見 Stage II 以上の G 2 群と G 3 群で有意に低下していたが, G 1 群の CD 8+CD 11- 細胞比率は健常対照群と有意差を示さなかった。実数値での検討では, CD 8+CD 11- 細胞数は健常対照群に比して G 2 群と G 3 群で有意に減少していたが, G 1 群の CD 8+CD 11- 細胞数は健常対照群に比して減少傾向を示すにとどまっていた。つまり, CD 8+CD 11- 細胞比率と細胞数は, Stage II 以上の原発性 SS において低下あるいは減少しているものであり, 唾液腺病変の進展に関与している可能性がある。

5) CD 4+HLA・DR+ 細胞と CD 8+HLA・DR+ 細胞: SLE, RA や SS などの膠原病では末梢血中の HLA・DR+ T 細胞比率は健常成人に比して上昇しているという報告<sup>3,4,30-32)</sup>が多いが, 不変<sup>17,29)</sup>であったとする報告もみられるので, HLA・DR+ T 細胞比率について一定した見解がないのが現状といえる。しかし, 最近の報告では, 原発性 SS 患者における HLA・DR+ T 細胞比率は末梢血<sup>3)</sup>と唾液腺<sup>43)</sup>の両者で上昇しており, しかも CD 8+HLA・DR+ 細胞比率が CD 4+HLA・DR+ 細胞比率に比して有意に上昇していた<sup>44)</sup>とされる。また PSL 治療中の SS 患者における HLA・DR+ T 細胞比率は未治療の患者に比して上昇しているという報告<sup>6)</sup>もみられる。Fox et al.<sup>45)</sup>は, SS 患者の唾液腺上皮組織に浸潤しているリンパ球中, 増加しているサブセットが HLA・DR+ T 細胞であり, この増加が組織局所における IFN- $\gamma$  の産生に関与していると述べている。また渡辺ら<sup>4)</sup>は, SS 患者における末梢血 HLA・DR+ T 細胞比率が健常成人に比して有意に上昇しており, この上昇と唾液腺病変の進展とが一致したことから, 末梢血 HLA・DR+ T 細胞が唾液腺造影所見進展度の指標になると考えている。

今回の著者の成績では, G 1 群の CD 4+HLA・DR+ 細胞比率は健常対照群と有意差を示さなかったが, G 2 群の CD 4+HLA・DR+ 細胞比率は健常対照群に比して有意の上昇を示した。また G 2 群は G 3 群に比しても有意の上昇を示した。しかし, 3 疾患群における CD 4+HLA・DR+ 細胞数は, いずれも健常対照群に比して増加傾向を示したにすぎなかった。CD 8+HLA・DR+ 細胞比率は, G 2 群と G 3 群において健常対照群に比して有意に増加していたが, G 1 群においては増加傾向を示したにすぎなかった。しかし, CD 8+HLA・DR+ 細胞数は, いずれの疾患群においても健常対照群に比して

増加傾向を示したにすぎなかった。つまり今回の検討は、唾液腺造影所見 Stage II 以上の G2 群における CD4+HLA・DR+ 細胞比率と CD8+HLA・DR+ 細胞比率が健常対照群に比して有意に上昇したことを明らかにしたといえる。G2 群では前述したようにリンパ球は有意に減少していた。それにもかかわらず、CD4+HLA・DR+ 細胞比率と CD8+HLA・DR+ 細胞比率の細胞数が健常対照群に比して増加傾向を示した今回の成績は注目に値する。この両サブセットの増加傾向は、それぞれ固有のサブセットの芽球化あるいは増殖過程に関連しているものと思われる。

6) 小括：今回の検討は、PSL 未投与の G1 群と G2 群における CD4+Leu8- 細胞数の減少および CD4+Leu8+ 細胞数の減少、さらに G2 群における CD8+CD11- 細胞数の減少を明らかにしたといえる。また G1 群の CD8+CD11- 細胞数が健常対照群に比して減少傾向を示したことも明らかになった。一方、G1 群と G2 群における CD8+CD11+ 細胞比率と CD8+CD11+ 細胞数は健常対照群と有意差を示さなかった。つまり、今回の成績は、PSL 未治療の原発性 SS では、サブレッサー機能に変化が認められないが、ヘルパー機能の低下、サブレッサーインデューサー機能の低下さらには細胞性細胞障害性機能の低下という広範囲にわたる T 細胞機能障害が存在することを示唆している。これら機能的リンパ球サブセット細胞数の減少は実数値の検討によってその詳細が明解になるものであり、2 カラー分析を用いたリンパ球サブセットの検討においても、1 カラー分析の場合と同様に、相対比率のみならず実数値の検討が不可欠といえる。

G3 群の CD8+CD11+ 細胞比率は G2 群に比して有意に上昇し、G3 群の CD8+CD11- 細胞比率は G2 群と差を示さなかった。したがって、G3 群の CD8+ 細胞比率が G2 群に比して有意に上昇を示した 1 カラー分析における成績は、CD8+CD11+ 細胞比率が G2 群に比して G3 群で有意に上昇していたことに基づくものといえる。つまり、PSL 投与による CD4/CD8 の低下は CD8+ 細胞比率の上昇によるものであり、この CD8+ 細胞比率の上昇は CD8+CD11+ 細胞比率の上昇に起因することが明らかになった。

## 2. 原発性 SS における唾液腺造影所見の進展度と B 細胞

従来、B 細胞比率については、上昇<sup>3,8,9)</sup>している、不変<sup>5,7,31,46)</sup>であるという報告があり、一定の意見がない。SS では B 細胞が外分泌腺や脾臓などの器官に集簇しており、唾液腺に浸潤しているリンパ球の約 20% を占め

ているという<sup>47,48,49)</sup>。さらに Moutsopoulos<sup>2)</sup>は、末梢血と唾液腺で増加している CD5+ B 細胞サブセットが原発性 SS における B 細胞の過剰活性化に基本的な役割を果たしており、この過剰活性化が自己抗体の出現や組織破壊に関与していると述べている。

今回の著者の成績では、CD20+ 細胞比率はすべての疾患群において健常対照群と有意差を示さなかった。一方、CD20+ 細胞数は、すべての疾患群において健常対照群に比して有意に減少しており、しかも 3 疾患群間に差がなかった。つまり、CD20+ 細胞数は、原発性 SS の発症に関与している可能性がある。

## 3. 原発性 SS における唾液腺造影所見の進展度と NK 細胞

### (1) 1 カラー分析による NK 細胞サブセット

SS 患者の NK 細胞比率については上昇<sup>3)</sup>している、低下<sup>12,13,50)</sup>しているという報告が混在しており、一定した意見はない。Struyf et al.<sup>12)</sup>は、Leu7+ 細胞数と CD16+ 細胞数に減少が認められたことから、NK 細胞活性の低下には IFN- $\gamma$ 、IL-2 あるいは IFN- $\alpha$  の欠損が関与しているものと推測している。

しかし今回の成績では、Leu7+ 細胞比率と CD16+ 細胞比率は健常対照群に比して有意に上昇していたが、Leu7+ 細胞数と CD16+ 細胞数は健常対照群と有意差を示さなかった。CD16+ 細胞は NK 活性を有する large granular lymphocyte である<sup>25)</sup>ことが知られている。CD16+ 細胞数が健常対照群に比して不変であった今回の成績から、原発性 SS における NK 活性は健常対照群と差がないといえよう。

一方、NK 活性は IFN によって増強される<sup>51)</sup>ことが知られている。原発性 SS ではこの IFN- $\alpha$  あるいは IFN- $\gamma$  による NK 活性増強作用は傷害されている<sup>12)</sup>という報告があり、原発性 SS における NK 細胞は IFN- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  を含めたサイトカインに対する応答機能も低下しているものと考えられている。したがって、原発性 SS における NK 細胞数が健常対照群に比して不変であっても、原発性 SS の NK 細胞活性は低下している可能性がある。

### (2) 2 カラー分析による NK 細胞サブセット

CD16+ 抗体と Leu7+ 抗体によって決定される三つの NK 細胞サブセットのうち、CD16+Leu7- 細胞が最も強い NK 活性を有し、CD16- Leu7+ 細胞は最も弱い NK 活性を有する<sup>25)</sup>とされている。Ichikawa et al.<sup>52)</sup>は、SS においては CD16+Leu7- 細胞比率と CD16+ Leu7+ 細胞比率に有意の上昇が認められないが、CD16- Leu7+ 細胞比率には有意の上昇が認められたと報告

している。

NK細胞についての今回の成績では、CD 16<sup>-</sup>Leu 7<sup>+</sup>細胞比率は、健常対照群に比して G 1 群と G 2 群で有意に上昇していたが、PSL 投与の G 3 群においては増加傾向を示したにとどまった。また CD 16<sup>+</sup>Leu 7<sup>+</sup>細胞比率は健常対照群に比して 3 疾患群で有意に上昇していたが、CD 16<sup>+</sup>Leu 7<sup>-</sup>細胞比率は 3 疾患群が健常対照群と有意差を示さなかった。つまり、1 カラー分析で上昇していた CD 16<sup>+</sup>細胞比率は、Leu 7<sup>-</sup>細胞比率の上昇によるものではなく、Leu 7<sup>+</sup>細胞比率の上昇によるといえよう。また今回の実数値による検討では、3 つの NK 細胞サブセットの相対比率と実数値は、すべての疾患群において健常対照群と有意差を示さず、疾患群間においても差を示さなかった。したがって、原発性 SS における NK 細胞活性は健常成人に比して不変と考えられ、NK 細胞は原発性 SS の唾液腺障害の進展に関与していないものと思われる。

## 結 論

原発性シェーグレン症候群(SS)におけるリンパ球機能異常を究明する目的で、FCM による 1 カラー分析および 2 カラー分析を用いて末梢血リンパ球サブセットを検討し、以下の成績を得た。なお、対象とした原発性 SS 患者 52 例は、Rubin & Holt による唾液腺造影所見と副腎皮質ステロイド(PSL)投与の有無から、Stage 0 ~ I で PSL 未投与の G 1 群(16 例)、Stage II ~ IV で PSL 未投与の G 2 群(23 例)、Stage II ~ IV で PSL 投与の G 3 群(13 例)の 3 群に分類し、健常成人群(17 例)の成績と比較した。

1. 1 カラー分析によると；(1) CD 4/CD 8 は原発性 SS の 3 疾患群において健常成人と差を示さなかった。一方、G 3 群の CD 4/CD 8 は G 2 群に比して有意に低下しており、この低下は CD 8<sup>+</sup>細胞比率の低下に起因していた。(2) 原発性 SS の 3 疾患群における CD 3<sup>+</sup>細胞数と CD 4<sup>+</sup>細胞数、および G 2 群と G 3 群における CD 8<sup>+</sup>細胞数は健常成人に比して有意に減少していた。(3) HLA・DR<sup>+</sup>細胞数は正常域にあり、CD 20<sup>+</sup>細胞数は有意に減少していた。(4) CD 16<sup>+</sup>細胞数および Leu 7<sup>+</sup>細胞数は正常域にあった。

2. 2 カラー分析によると；(1) 原発性 SS の 3 疾患群における CD 4<sup>+</sup>Leu 8<sup>-</sup>細胞数と CD 4<sup>+</sup>Leu 8<sup>+</sup>細胞数、および G 2 群と G 3 群における CD 8<sup>+</sup>CD 11<sup>-</sup>細胞数は有意に減少していたが、CD 8<sup>+</sup>CD 11<sup>+</sup>細胞数は正常域にあった。(2) G 3 群の CD 8<sup>+</sup>CD 11<sup>+</sup>細胞比率は G 2 群に比して有意に上昇していたが、G 3 群の CD 8

+CD 11<sup>-</sup>細胞比率は G 2 群と差を示さなかった。つまり、1 カラー分析で認められた G 3 群における CD 8<sup>+</sup>細胞比率の上昇は、CD 8<sup>+</sup>CD 11<sup>+</sup>細胞比率の上昇に起因している。(3) CD 4<sup>+</sup>HLA・DR<sup>+</sup>細胞数、CD 8<sup>+</sup>HLA・DR<sup>+</sup>細胞数、CD 16<sup>-</sup>Leu 7<sup>+</sup>細胞数、CD 16<sup>+</sup>Leu 7<sup>+</sup>細胞数および CD 16<sup>+</sup>Leu 7<sup>-</sup>細胞数はいずれも正常域にあった。

以上のことから、今回の検討は、未治療の原発性 SS において広範な T 細胞サブセットおよび B 細胞の細胞数の減少が認められるが、活性化 T 細胞と NK 細胞の細胞数には変化がないことを明らかにしたことになる。さらに原発性 SS においてはサプレッサー機能と NK 細胞活性は変化を示さないが、ヘルパー機能の低下、サプレッサーインデューサー機能の低下、細胞性細胞障害性機能の低下という広範囲の T 細胞機能障害が存在していることも明確になったといえる。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました石川兵衛教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、御校閲、御助言を賜りました細菌学教室極葉周三教授ならびに耳鼻咽喉科学教室松永 喬教授に深謝いたします。さらに直接、御指導、御教示いただきました土肥和紘講師に感謝します。また終始、御協力いただきました第 1 内科学教室腎研究班の諸兄に感謝の意を表します。

本論文の要旨は第 18 回 日本臨床免疫学会総会(1990 年 6 月、東京都)において発表した。

## 文 献

- 1) Sjögren, H. : Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca. Acta Ophthal. Suppl. II : 1, 1933.
- 2) Moutsopoulos, H. M. : Immunopathogenesis of Sjögren's syndrome. Israel J. Med. Sci. 24 : 737, 1988.
- 3) Ichikawa, Y., Shimizu, H., Takahashi, K., Yoshida, M., Moriuchi, J., Takaya, M. and Arimori, S. : Lymphocyte subsets of the peripheral blood in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. Clin. Exp. Rheumatol. 7 : 55, 1989.
- 4) 渡辺一郎, 佐川 昭, 中林 透, 向井正也, 藤咲淳, 中川昌一 : Primary Sjögren 症候群における末梢血 HLA・DR 陽性 T 細胞, CD 45 R 陽性 CD 4 細胞の臨床的検討. リウマチ 30 : 181, 1990.
- 5) Celenligil, H., Kansu, E., Ruacan, S., Eratalay, K. and Irkec, M. : Characterization of peripheral blood and Salivary gland lymphocytes in secon-

- dary Sjögren's syndrome. *Ann. Dent.* **49**: 18, 1990.
- 6) **Ichikawa, Y., Shimizu, H., Yoshida, M. and Arimori, S.**: Activation of T cell subsets in the peripheral blood of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* **33**: 1674, 1990.
  - 7) **Moutsopoulos, H. M. and Fauci, A. S.**: Immunoregulation in Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* **65**: 519, 1980.
  - 8) **Morimoto, C., Reinherz, E. L., Nadler, L. M., Distaso, J. A., Steinberg, A. D. and Schlossman, S. F.**: Comparison in T<sup>+</sup> and B<sup>-</sup> cell markers in patients with Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **22**: 270, 1982.
  - 9) **Bakhshi, A., Miyasaka, N., Kavathas, P., Daniels, T. E., Strand, C. V., Herzenberg, L. A. and Talal, N.**: Lymphocyte subsets in Sjögren's syndrome: A quantitative analysis using monoclonal antibodies and the fluorescence-activated cell sorter. *J. Clin. Lab. Immunol.* **10**: 63, 1983.
  - 10) **Fox, R. I., Carstens, S. A., Fong, S., Robinson, C. A., Howell, F. and Vaughan, J. H.**: Use of monoclonal antibodies to analyze peripheral blood and salivary gland lymphocyte subsets in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* **25**: 419, 1982.
  - 11) **Jabs, D. A., Arnett, F. C., Bias, W. B. and Beale, M. G.**: Familial abnormalities of lymphocyte function in a large Sjögren's syndrome kindred. *J. Rheumatol.* **13**: 320, 1986.
  - 12) **Struyf, N. J., Snoeck, H. W., Bridts, C. H., De Clerck, L. S. and Stevens, W. J.**: Natural killer cell activity in Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus: Stimulation with interferons and interleukin-2 and correlation with immune complexes. *Ann. Rheum. Dis.* **49**: 690, 1990.
  - 13) **Miyasaka, N., Seaman, W., Bakshi, A., Sauvezie, B., Strand, V., Pope, R. and Talal, N.**: Natural killing activity in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* **26**: 954, 1983.
  - 14) **Slade, J. D. and Hepburn, B.**: Prednisone induced alterations of circulating human lymphocyte subsets. *J. Lab. Clin. Med.* **101**: 479, 1983.
  - 15) **Bernard, A., Bernstein, I., Boumsell, L., Dausset, J., Evans, R., Hansen, J., Haynes, B., Kersey, J., Knapp, W., McMichael, A., Milstein, C., Reinherz, E., Ritts, R. E. and Schlossman, S. F.**: Differentiation human leukocyte antigens: A proposed nomenclature. *Immunol. Today* **5**: 158, 1984.
  - 16) **Gatenby, P. A., Kansas, G. S., Xian, C. Y., Evans, R. L. and Engleman, E. G.**: Dissection of immunoregulatory subpopulation of T lymphocytes within the helper and suppressor sublineages in man. *J. Immunol.* **129**: 1997, 1982.
  - 17) **Mohaghehpour, N., Benike, C. J., Kansas, G., Bieber, C. and Engleman, E. G.**: Activation of antigen-specific suppressor T cells in the presence of Cyclosporin requires interactions between T cells of inducer and suppressor lineage. *J. Clin. Invest.* **72**: 2092, 1983.
  - 18) **大藤 眞**: 昭和52年度研究報告総括, シェーグレン病診断基準. 厚生省特定疾患シェーグレン病調査研究班, 昭和52年度研究業績. p3, 1978.
  - 19) **Rubin, P. and Holt, J. F.**: Secretory sialography in diseases of the major salivary glands. *Amer. J. Roentgenol.* **77**: 575, 1957.
  - 20) **Ledbetter, J. A., Evans, R. L., Lipinski, M., Cunningham-Rundles, C., Good, R. A. and Herzenberg, L. A.**: Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J. Exp. Med.* **153**: 310, 1981.
  - 21) **Evans, R. L., Wall, D. W., Platsoucas, C. D., Siegal, F. P., Fikrig, S. M., Testa, C. M. and Good, R. A.**: Thymus-dependent membrane antigens in man: Inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to T<sub>H2</sub> antigen. *J. Immunol.* **78**: 544, 1981.
  - 22) **Lampson, L. A. and Levy, R.**: Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J. Immunol.* **125**: 293, 1980.
  - 23) **Stashenko, P., Nadler, L. M., Hardy, R. and Schlossman, S. F.**: Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J. Immunol.* **125**: 1678, 1980.
  - 24) **Abo, T. and Balch, C. M.**: A differentiation

- antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody(HNK-1). *J. Immunol.* **127**: 1024, 1981.
- 25) **Lanier, L. L., Le, A. M., Phillips, J. H., Warner, N. L. and Babcock, G. F.**: Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7(HNK-1) and Leu-11(NK-15) antigens. *J. Immunol.* **131**: 1789, 1983.
- 26) **Landay, A., Gartland, G. L. and Clement, L. T.**: Characterization of a phenotypically distinct subpopulation of Leu-2<sup>+</sup> cells that suppresses T cell proliferative responses. *J. Immunol.* **131**: 2757, 1983.
- 27) **Clement, L. T., Dagg, M. K. and Landay, A.**: Characterization of human lymphocyte subpopulations: Alloreactive cytotoxic T-lymphocyte precursor and effector cells are phenotypically distinct from Leu 2<sup>+</sup> suppressor cells. *J. Clin. Immunol.* **4**: 395, 1984.
- 28) **Reinherz, E. L., Kung, P. C., Pesando, J. M., Ritz, J., Goldstein, G. and Schlossman, S. F.**: Ia determinants on human T-cell subsets defined by monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* **150**: 1472, 1979.
- 29) **Sato, K., Miyasaka, N., Yamaoka, K., Okuda, M., Yata, J. and Nishioka, K.**: Quantitative defect of CD 4+2 H 4+ cells in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* **30**: 1407, 1987.
- 30) **Sauvezie, B., Miyasaka, N., Charron, D., Kielich, C., Loeb, J., Daniels, T. E. and Talal, N.**: An increase in peripheral blood Ia-positive T cells in Sjögren's syndrome correlates with a decrease in the autologous mixed lymphocyte response. *Clin. Exp. Immunol.* **49**: 50, 1982.
- 31) **Youinou, P., Pennek, Y. L., Blaschek, M. A., Gentric, A., Jouquan, J., Lamour, A. and Angelidis, P.**: Activation of peripheral blood lymphocytes in patients with primary Sjögren's syndrome. *Rheumatol. Int.* **8**: 125, 1988.
- 32) **Goto, M., Miyamoto, T., Nishioka, K. and Uchida, S.**: T cytotoxic and helper cells are markedly increased, and T suppressor and inducer cells are markedly decreased, in rheumatoid synovial fluids. *Arthritis Rheum.* **30**: 737, 1987.
- 33) **Swain, S. L.**: T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol. Rev.* **74**: 129, 1983.
- 34) **Meuer, S. C., Schlossman, S. F. and Reinherz, E. L.**: Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T 4<sup>+</sup> and T 8<sup>+</sup> effector T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 4395, 1982.
- 35) **Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L.**: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**: 2348, 1986.
- 36) **Morgan, D. A., Ruscetti, F. W. and Gallo, R.**: Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* **193**: 1007, 1976.
- 37) **Fung, M. C., Hapel, A. J., Ymer, S., Cohen, D. R., Johnson, R. M., Campbell, H. D. and Young, I. G.**: Molecular cloning of cDNA for murine interleukin-3. *Nature* **307**: 233, 1984.
- 38) **Gray, P. W., Leung, D. W., Pennica, D., Yelverton, E., Najarian, R., Simonsen, C. C., Derynck, R., Sherwood, P. J., Wallace, D. M., Berger, S. L., Levinson, A. D. and Goeddel, D. V.**: Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. *Nature* **295**: 503, 1982.
- 39) **Wong, G. G., Witek, J. S., Temple, P. A., Wilkens, K. M., Leary, A. C., Luxenberg, D. P., Jones, S. S., Brown, E. L., Kay, R. M., Orr, E. C., Shoemaker, C., Golde, D. W., Kaufman, R. J., Hewick, R. M., Wang, E. A. and Clark, S. C.**: Human GM-CSF: Molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science* **228**: 810, 1985.
- 40) **Yokota, T., Otsuka, T., Mosmann, T., Banchereau, J., DeFrance, T., Blanchard, D., De Vries, J. E., Lee, F. and Arai, K.**: Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell and

- T-cell stimulating activities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5894, 1986.
- 41) Kinashi, T., Harada, N., Severinson, E., Tanabe, T., Sideras, P., Konishi, M., Azuma, C., Tominaga, A., Bergstedt-Lindqvist, S., Takahashi, M., Matsuda, F., Yaoita, Y., Takatsu, K. and Honjo, T.: Cloning of complementary DNA encoding T-cell replacing factor and identity with B-cell growth factor II. Nature 324: 70, 1986.
- 42) Gerli, R., Bertotto, A., Cerneti, C., Agea, E., Crupi, S., Arcangeli, C., Spinozzi, F., Galandrini, R. and Rambotti, P.: Anti-CD 3 and anti-CD 2-induced T-cell activation in primary Sjögren's syndrome. Clin. Exp. Rheumatol. 7/S-3: 129, 1989.
- 43) 高屋正敏, 市川幸延, 郡山健治, 清水宏明, 有森 茂: Sjögren 症候群における唾液腺 T リンパ球亜群の免疫組織学的検討. リウマチ 24: 250, 1984.
- 44) Ichikawa, Y., Shimizu, H., Yoshida, M. and Arimori, S.: Activation antigens expressed on T-cells of the peripheral blood in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. Clin. Exp. Rheumatol. 8: 243, 1990.
- 45) Fox, R. I., Bumol, T., Fantozzi, R., Bone, R. and Schreiber, R.: Expression of histocompatibility antigen HLA-DR by salivary gland epithelial cells in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum. 29: 1105, 1986.
- 46) Dauphinee, M. J., Tovar, Z., Ballester, A. and Talal, N.: The expression and Function of CD 3 and CD 5 in patients with primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum. 32: 420, 1989.
- 47) Whaley, K., Glen, A. C. A., MacSween, R. N. M., Deodhar, S., Dick, W. C., Nuki, G., Williamson, J. and Buchanan, W. W.: Immunological responses in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. Clin. Exp. Immunol. 9: 721, 1971.
- 48) Miyasaka, N., Sauvezie, B., Pierce, D. A., Daniels, T. E. and Talal, N.: Decreased autologous mixed lymphocyte reaction in Sjögren's syndrome. J. Clin. Invest. 66: 928, 1980.
- 49) Fauci, A. S. and Moutsopoulos, H. M.: Polyclonally triggered B cells in the peripheral blood and bone marrow of normal individuals and in patients with systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum. 24: 577, 1981.
- 50) Goto, M., Tanimoto, K., Chihara, T. and Horiuchi, Y.: Natural cell-mediated cytotoxicity in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 24: 1377, 1981.
- 51) Djeu, J. Y., Heinbaugh, J. A., Holden, H. T. and Herberman, R. B.: Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers. J. Immunol. 122: 175, 1979.
- 52) Ichikawa, Y., Yoshida, M., Takaya, M., Uchiyama, M., Shimizu, H. and Arimori, S.: Circulating natural killer cells in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum. 28: 182, 1985.