

## 開心術におけるBリンパ球機能の変動

奈良県立医科大学麻酔科学教室

平井 勝治

### CHANGES IN B LYMPHOCYTE FUNCTION FOLLOWING OPEN HEART SURGERY

KATSUJI HIRAI

*The Department of Anesthesiology, Nara Medical University*

Received March 30, 1990

*Summary:* The present study was attempted to elucidate the mechanism which account for modification of immunoglobulin synthesis following open heart surgery. Operations have been performed on 20 cases of coronary artery disease, 12 cases of acquired valvular disease and 4 cases of congenital heart disease using cardiopulmonary bypass (CPB).

As an assesment of B lymphocyte function in vitro, protein A plaque method (Gronowicz) was employed; numbers of IgM, IgG plaque forming cell (PFC) induced by staphylococcus aureus Cowan 1 (SAC) and pokeweed mitogen (PWM) decreased immediately after CPB and the decrease continued for as long as three days.

Interleukin-2 (IL-2) production in mononuclear cell (MNC) was significantly suppressed after CPB, but Interleukin-1 production was not. The numbers of IgG PFC provoked exogenous IL-2 were attenuated following cardiac surgery in these patients.

In conclusion, these results suggested that following CPB, suppression of IL-2 production in MNC and attenuated response to exogenous IL-2 were correlated to the impairment of the B lymphocyte function. The clinical application of immunomodulators may be useful in making a defense against bacterial and viral infections resulting from the depression of antibody production after open heart surgery.

#### Index Terms

immunosuppression, open heart surgery, antibody production, cytokine, B lymphocyte

#### 1 結 言

外科手術における患者管理の技術の向上により手術適応が拡大し、近年開心術においてリスクの高い患者の占める割合が増加し、特に術後長期に呼吸循環管理を必要とするような重症例では感染症対策が手術成績を左右するといっても過言ではない。すでに麻酔と外科手術が免疫防御系に影響を与えることは知られている<sup>1-7)</sup>。生体の感染防御機構は補体などの液性因子や多核白血球や網内系細胞による一次防御がなされ、次に免疫応答がおこ

り体液性あるいは細胞性免疫が成立する。一次防御について開心術では好中球の増加がおこり<sup>8)</sup>、その食食殺菌能が低下すること<sup>9)</sup>や補体の変化によるオプニソン作用の低下<sup>10)</sup>が報告されている。開心術による免疫応答の変化としてはTリンパ球(以下T細胞)を中心とした細胞性免疫の低下<sup>8)9)11)12)</sup>やナチュラルキラー細胞の機能低下が認められている<sup>14)15)</sup>。しかし、in vitro でBリンパ球(以下B細胞)の機能を調べる適切な方法がなかったため、体外循環により免疫グロブリンが減少すると報告されている<sup>16)-18)</sup>以外、体液性免疫についての研究は少な

い<sup>19)-20)</sup>。血中の免疫グロブリンはすでに産生されたものであり、その血中濃度の高低はかならずしもB細胞の機能を示すものではない。それゆえ免疫グロブリンを産生するB細胞の機能の変化を調べるの方が重要と考えられる。B細胞は抗原刺激などにより活性化され増殖分化し、免疫グロブリンを産生する抗体産生細胞となる。そこで protein A plaque 法<sup>21)</sup>を用いて抗体産生細胞を測定し、開心術がB細胞の機能にどのような影響を及ぼすかを検討した。

また近年免疫学の進歩によりB細胞の分化成熟において体液性因子であるサイトカインの多彩な役割が明らかになってきている<sup>22)-23)</sup>。そこで開心術におけるB細胞の機能の変化と単核球が分泌するサイトカインの役割を解明する目的で本研究を行った。

## II 研究方法

### 1) 対象

対象は1985年7月から1989年4月までに奈良県立医科大学附属病院で体外循環を用いておこなった開心術36例(虚血性心疾患20例, 後天性心疾患12例, 先天性心疾患4例)で, 男24例, 女12例, 平均年齢57歳(36歳から72歳)であった。

### 2) 麻酔方法

麻酔前投薬として, スコポラミン0.4 mg, ペチジン50 mg, ヒドロキシジン50 mgを麻酔導入30分前に筋注した。麻酔導入はフェンタニール0.5-0.7 mgまたはモルヒネ20 mg, ジアゼパム10 mg, バンクロニウム8 mgでおこなった。麻酔維持は大量フェンタニール麻酔35例, モルヒネ麻酔1例であった。体外循環は膜型人工心肺を用い, 食道温28°Cの中等度低体温を併用した。平均麻酔時間は547分(420分から755分)であった。

### 3) 測定項目および採血法

血液サンプルは, 麻酔導入前, 体外循環直後, 術後1日, 術後3日にそれぞれヘパリン加採血し, 術後の採血は午前9時におこなった。測定項目は, ①血中のIgMとIgGの免疫グロブリン濃度, ②リンパ球活性化物質により誘導されたIgMとIgGの抗体産生細胞数, ③末梢血中のIgMとIgGの抗体産生細胞数, ④リンパ球のサブピュレーション, ⑤リンパ球芽球化試験, ⑥単核球のサイトカイン産生能, ⑦ recombinant IL-2 に対するB細胞の反応性, ⑧末梢血B細胞のIL-2 レセプター陽性細胞出現率, ⑨血中のコルチゾール濃度である。

リンパ球活性化物質(以下マイトジェン)として Lipopolysaccharide (LPS, Difco Lab.) Pokeweed mitogen (PWM, Pharmacia), Phytohemagglutinin

(PHA, Pharmacia), Staphylococcus aureus Cowan 1 (SAC, Calbiochem), Concanavalin A (Con A, Sigma), recombinant IL-2 (味の素)を用いた。

### 4) リンパ球培養法

採血後, Conray-Ficoll による重層法でリンパ球を分離し, 細胞数が $10^6$ /mlとなるようにマイトジェンとともに, 5%牛胎児血清含有 RPMI 1640 培養液(ニッスイ)に浮遊し, マルチプレート96 U(住友ベークライト)に1wellあたり0.2 mlずつ分注した。マイトジェンとして, PWM (100  $\mu$ g/ml), SAC (0.01 vol%) の濃度になるように加え, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>の条件で144時間培養した。

### 5) 抗体産生細胞(PFC)の測定

Gronowicz<sup>21)</sup>らの protein A plaque 法にて, 非特異的 IgM および IgG の抗体産生細胞を検出した。

すなわち, 培養細胞浮遊液, protein A (Repligen) を塩化クロムにて結合させた15%SRBC溶液, 10倍希釈モルモット補体, ラビット抗ヒトIgM, IgG抗体(DAKO)の4者をそれぞれ25  $\mu$ l ずつ, 1%溶融寒天(0.2 ml)に加えて, プラスチックシャーレ(日水)に撒き, 37°Cで4時間培養し, 出現したPFC数を算定した。

### 6) 単核球のサイトカインの産生能

インターロイキン1(以下IL-1)産生能には単球を細胞数が $10^6$ /mlとなるように5%牛胎児血清含有 RPMI 1640 培養液に浮遊し, LPS (20  $\mu$ g/ml)を加え48時間培養した上清を用いた。測定はC3H/HeJマウスの胸腺細胞に単球の培養上清と suboptimal dose の Con A (0.5  $\mu$ g/ml)を加え, 5%牛胎児血清含有 RPMI 1640 培養液で細胞数を $4 \times 10^6$ /mlに調整し, マイクロプレートの各wellに200  $\mu$ l ずつ撒き培養した。37°Cで48時間培養し, <sup>3</sup>H-thymidine (0.8  $\mu$ Ci/well)を加え, さらに12時間培養した後に細胞を回収し, 細胞への thymidine の取り込みを液体シンチレーションカウンターにて測定した。マウスの胸腺細胞と Con A に培養上清を加えたカウント値を培養上清を加えないカウント値で割ったものを Stimulation Index として示した。

インターロイキン2(以下IL-2)の産生能は検体として分離したリンパ球 $10^6$ /mlに Con A (5  $\mu$ g/ml)を加え, 5%牛胎児血清含有 RPMI 1640 培養液で37°Cで24時間培養した上清を用いた。測定は放射性免疫測定法によりおこなった。IL-2の濃度は Gillis<sup>24)</sup>らの表現法を用いた。

### 7) リンパ球芽球化試験

リンパ球芽球化試験はリンパ球を $10^6$ /mlの細胞数となるように5%牛胎児血清含有 RPMI 1640 培養液に浮

遊し、マイトジェンとして最終濃度がPWM (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), PHA (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), SAC (0.01 vol%) となるようにそれぞれ加え、37°Cで96時間培養後、 $^3\text{H}$ -thymidine (0.8  $\mu\text{Ci}/\text{well}$ ) を添加し、4時間後リンパ球内への thymidine の取り込みを液体シンチレーションカウンターにて測定した。

8) recombinant IL-2 に対するB細胞の反応性

B細胞の IL-2 に対する反応性は術前と術後1日目を比較した。採血後リンパ球の細胞数が  $10^6/\text{ml}$  となるように、5%牛胎児血清含有 RPMI 1640 培養液に浮遊し、recombinant IL-2 (味の素) を (1000 単位/ml) の濃度となるように加え、37°Cで6日間培養し、protein A plaque 法による IgG の PFC 数の算定によりおこなった。

9) 末梢血中のB細胞の IL-2 レセプター陽性細胞出現率

末梢血中の B細胞の IL-2 レセプター陽性細胞は phycoerythrin (以下 PE) 標識抗 IL-2 レセプター抗体 (CD 25) (Becton Dickinson) と fluorescein isothiocyanate (以下 FITC) 標識 B 1 抗体 (CD 20) (Coulter) のモノクローナル抗体を用いたフローサイトメーターによる2カラー分析により検出した。

10) 活性化B細胞のIL-2 レセプター陽性細胞出現率

末梢細胞のリンパ球を重層法により分離し、細胞数が  $10^6/\text{ml}$  となるように、5%牛胎児血清含有 RPMI 1640 培養液に浮遊し、PWM (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) と SAC (0.01 vol

%) を加えて3日間培養し、B細胞のなかで IL-2 レセプター陽性細胞を PE 標識抗 IL-2 レセプター抗体 (CD 25) (Becton Dickinson) と FITC 標識 B 1 抗体 (CD 20) (Coulter) のモノクローナル抗体を用いたフローサイトメーターによる2カラー分析により検出した。

末梢血中の IgM と IgG の濃度は免疫比濁法により測定した。

末梢血中の T細胞と B細胞の比率解析には FITC 標識 B 1 抗体 (CD 20) (Coulter) と FITC 標識 Leu 1 抗体 (CD 5) (Becton Dickinson) のモノクローナル抗体を用い、T細胞のサブセットの解析には FITC 標識 Leu 3a 抗体 (CD4) (Becton Dickinson) と FITC 標識 Leu 2a 抗体 (CD8) (Becton Dickinson) のモノクローナル抗体を用いてフローサイトメーターにより測定した。

血中のコルチゾールの濃度は放射性免疫チューブ固相法により測定した。

推計学的処理

推計学的処理は術前値との間に Wilcoxon rank sum test を行い、5%の危険率を持って有意差ありとした。

III 結 果

1) 血中の IgM と IgG の免疫グロブリン濃度

Fig. 1A のように血中の IgM の濃度は術前に比較し、体外循環直後より低下し術後3日まで有意に低下した ( $P < 0.05$ )。Fig. 1B は血中の IgG の濃度を示すが IgM と同様に術後3日まで有意に低下した ( $P <$

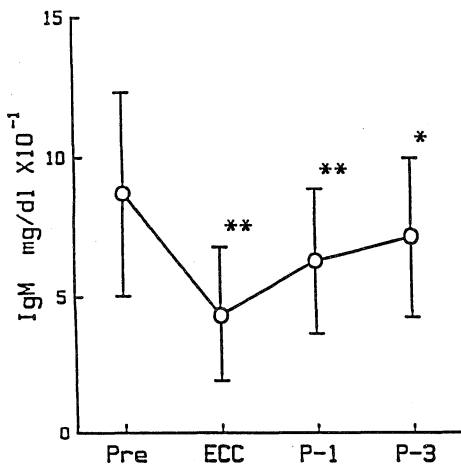


Fig. 1A

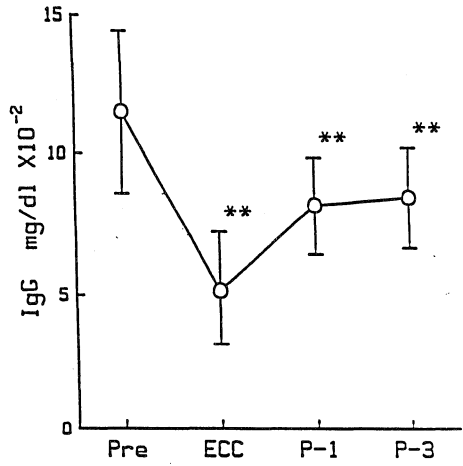


Fig. 1B

Fig. 1. Serum immunoglobulin concentration of IgM and IgG during open heart surgery. Pre: preoperative, ECC: post ECC, P-1: postoperative first day, P-3: postoperative third day. All values are mean  $\pm$  S. D.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with preoperative value

0.01).

2) マイトジェンにより誘導された IgM と IgG の抗体産生細胞数

Table 1. はマイトジェンにより誘導されたリンパ球 10<sup>6</sup>個あたりの IgM と IgG の抗体産生細胞 (以下 PFC) 数を示す. まず IgM の PFC 数を見ると PWM に刺激された PFC 数は体外循環直後から著明に減少し, 術後 1 日には術前値の 13% まで低下した (P<0.01). また SAC に刺激された PFC 数も体外循環直後より有意に減

少し, 術前値の 10% となった. (P<0.05). 次に IgG の PFC 数を見ると, PWM に活性化された PFC 数は IgM と同様に術後 3 日まで著明に減少した (P<0.05). また SAC に刺激された PFC 数も体外循環後から術後 3 日まで有意に減少した (P<0.05).

3) 末梢血中の spontaneous IgM と IgG の抗体産生細胞数

Fig. 2 は末梢血中のリンパ球 10<sup>6</sup>個あたりの IgM と IgG の PFC 数を示す. IgM の PFC 数 (Fig. 2A) は術

Table 1. Changes in the numbers of IgM and IgG plaque forming cells induced by PWM and SAC during open heart surgery  
PFC: plaque forming cell, MNC: mononuclear cell  
PWM: pokeweed mitogen, SAC: staphylococcus aureus Cowan 1  
Pre: preoperative, ECC: post ECC, P-1: postoperative first day, P-3: postoperative third day  
All values are mean ± S.D.  
\* p<0.05, \*\* p<0.01 compared with preoperative value

		PFC/10 <sup>6</sup> MNC			
		Pre	ECC	P-1	P-3
control	IgM	46±30	64±71	109±84 *	119±121
	IgG	295±332	312±357	756±1494	476±768
PWM	IgM	2359±2096	516±564 **	304±390 **	565±626 *
	IgG	4006±3548	1594±2177**	1531±1988*	1364±1192*
SAC	IgM	5992±6000	582±740 *	215±266 *	472±811 *
	IgG	2697±2121	629±787 *	555±483 *	415±251 *

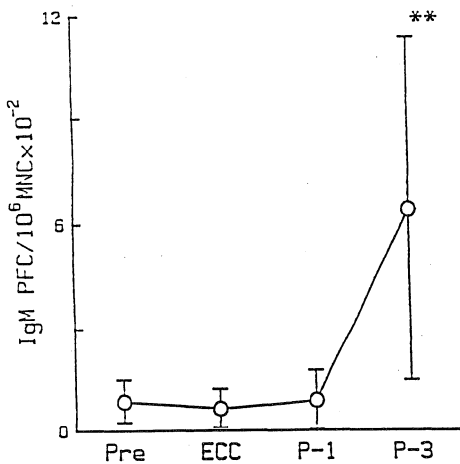


Fig. 2A

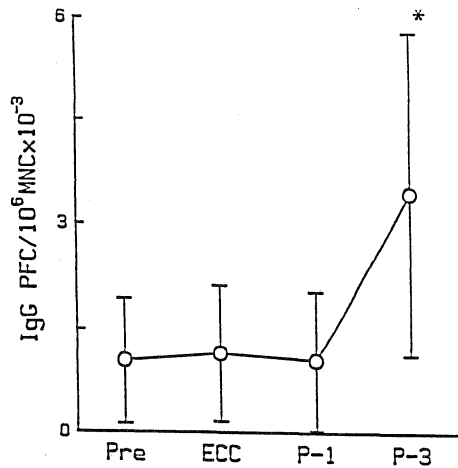


Fig. 2B

Fig. 2. Changes in the numbers of IgM and IgG spontaneous plaque forming cells in peripheral blood during open heart surgery.

Pre: preoperative, ECC: post ECC, P-1: postoperative first day, P-3: postoperative third day

All values are mean ± S.D.

\* p<0.05, \*\* p<0.01 compared with preoperative value

後1日まで変化は見られないが術後3日には術前値と比較して有意に増加した(745%) (P<0.01). またIgGのPFC数 (Fig. 2B) も術前値 1023±963 (平均値±標準偏差)個に対し, 術後3日には3450±2342個まで有意に増加した (P<0.05).

4) 末梢血中のリンパ球のサブポピュレーションとT細胞のサブセット

①末梢血中のT細胞の割合は体外循環直後から有意に低下し, 術後3日まで持続した(P<0.05). B細胞の分画は体外循環直後は低下したが, 術後1日, 術後3日も術前値に比べ有意に増加した (P<0.05) (Fig. 3)

②CD4 (Leu 3a) 陽性細胞

CD4 陽性の比率は体外循環直後から有意に低下し (P<0.01), 術後3日でも術前値まで回復しなかった (Fig. 4A). CD4 陽性細胞数は術後1日から減り始め, 術後3日に有意に減少した (P<0.05) (Table 2.).

③CD8 (Leu 2a) 陽性細胞

Fig. 4B は末梢血中の CD8 陽性細胞の比率を示すが, 体外循環直後は有意に上昇した (P<0.05) が, 術後1日, 術後3日には術前値に戻った. CD8 陽性細胞数を見ると術後1日より減少傾向にあり, 術後3日には有意に減少した (P<0.01) (Table 2.).

④CD4 陽性細胞/CD8 陽性細胞 (Leu 3a/Leu 2a) 比

Fig. 5 は CD4 陽性細胞/CD8 陽性細胞 (Leu 3a/Leu 2a) 比を示すが, 術前に比較して, 体外循環直後,

術後1日に有意に低下したが(P<0.01), 術後3日には術前値まで回復した.

5) リンパ球芽球化試験

PWM 刺激によるリンパ球の増殖反応は, 体外循環直

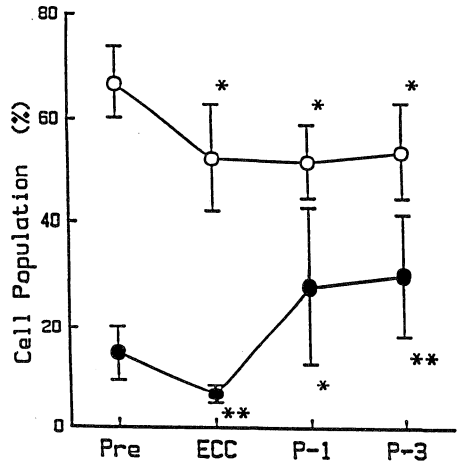


Fig. 3. Proportions of T and B lymphocytes in peripheral blood during open heart surgery.

○: T lymphocyte, ●: B lymphocyte  
Pre: preoperative, ECC: post ECC, P-1: postoperative first day, P-3: postoperative third day  
All values are mean ± S.D.  
\* p<0.05, \*\* p<0.01 compared with preoperative value

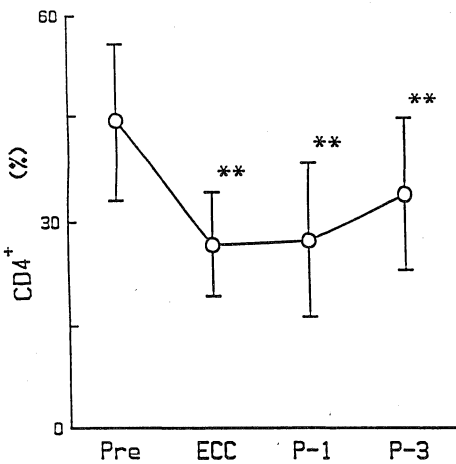


Fig. 4A

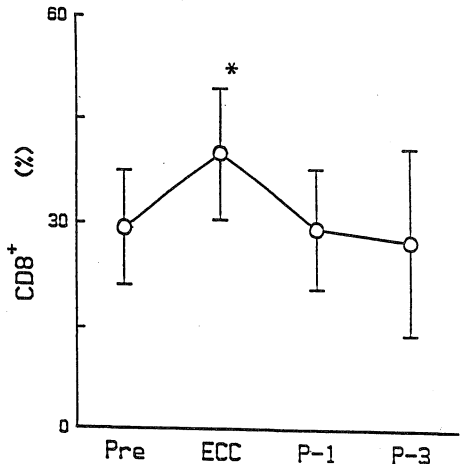


Fig. 4B

Fig. 4. Kinetics of the percentage of CD4+ and CD8+ cells in peripheral blood during open heart surgery.

Pre: preoperative, ECC: post ECC, P-1: postoperative first day, P-3: postoperative third day  
All values are mean ± S.D.

\* p<0.05, \*\* p<0.01 compared with preoperative value

後のみ有意に低下した ( $P < 0.05$ ). SAC を加えたリンパ球の thymidine の取り込みは、術後1日、術後3日とも有意に低下した ( $P < 0.05$ ). PHA に対するリンパ球の反応は体外循環直後に低下傾向がみられたが、開心術を通じて変化しなかった (Table 3.).

6) 単球のサイトカイン産生能

① 単球の IL-1 産生能をみると開心術を通じて thymidine のカウント値は変化しなかった (Fig. 6A). またコントロール値に対する増加率である Stimulation Index も変化しなかった.

② IL-2 産生能は術前  $11.25 \pm 4.13$  単位/ml (平均値  $\pm$  標準偏差) に対し、体外循環直後から減少し、術後1日には  $4.15 \pm 3.75$  単位/ml と有意に低下した ( $P < 0.01$ ). そして術後3日には術前値まで回復した (Fig. 6B).

7) B細胞の IL-2 に対する反応性

リンパ球  $10^6$ 個あたりの IgG の PFC 数をみると術前  $6005 \pm 1731$  (平均値  $\pm$  標準偏差) に対し、術後は  $1799 \pm 661$  と有意に減少した ( $P < 0.05$ ) (Fig. 7A). 個体差を是正するために Stimulation Index (S.I.) として、IL-2 を添加した PFC 数をコントロールの PFC 数で除し

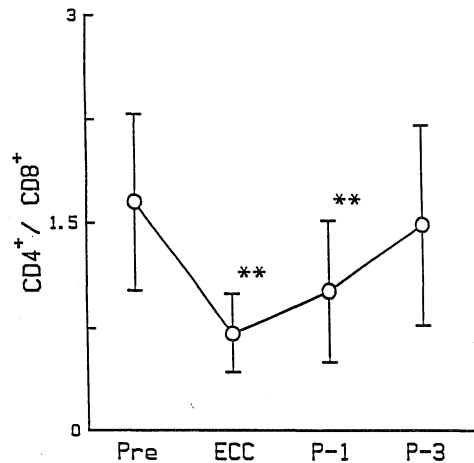


Fig. 5. Changes in ratio of CD4+ / CD8+ in peripheral blood during open heart surgery.

Pre: preoperative, ECC: post ECC, P-1: postoperative first day, P-3: postoperative third day

All values are mean  $\pm$  S.D.

\*\*  $p < 0.01$  compared with preoperative value

Table 2. Changes in the numbers of lymphocytes and CD4+ and CD8+ cells in peripheral blood during open heart surgery

Pre: preoperative, P-1: postoperative first day,

P-3: postoperative third day

All values are mean  $\pm$  S.D.

\*  $p < 0.05$  compared with preoperative value

	Pre	P-1	P-3
	mm <sup>-3</sup>		
LYMPHOCYTES	1954 $\pm$ 1399	1628 $\pm$ 969	1029 $\pm$ 565
CD4+	830 $\pm$ 581	470 $\pm$ 442	353 $\pm$ 241*
CD8+	574 $\pm$ 455	453 $\pm$ 234	244 $\pm$ 130*

Table 3. Lymphocyte responses to PWM, PHA and SAC during open heart surgery

PWM: pokeweed mitogen, PHA: phytohemagglutinin,

SAC: staphylococcus aureus Cowan I

Pre: preoperative, ECC: post ECC, P-1: postoperative first day, P-3: postoperative third day

All values are mean  $\pm$  S.D.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with preoperative value

	<sup>3</sup> H-thymidine incorporation			
	Pre	ECC (c. p. m.)	P-1	P-3
-control	1356 $\pm$ 890	1341 $\pm$ 1135	626 $\pm$ 376 *	828 $\pm$ 723
PWM	16935 $\pm$ 10774	7397 $\pm$ 2395*	16247 $\pm$ 16064	13919 $\pm$ 10196
PHA	25596 $\pm$ 26371	11025 $\pm$ 5452	21208 $\pm$ 14407	26675 $\pm$ 22591
SAC	3961 $\pm$ 2706	2144 $\pm$ 1080	1621 $\pm$ 1696*	1358 $\pm$ 1194**

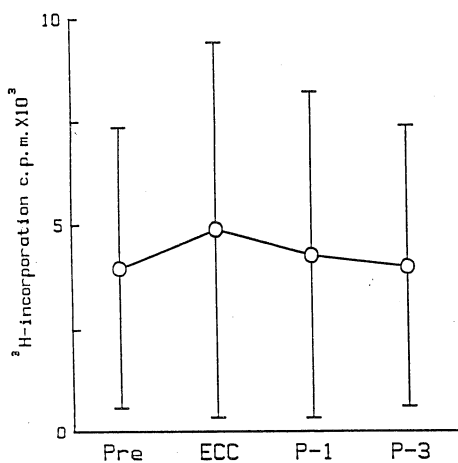


Fig. 6A

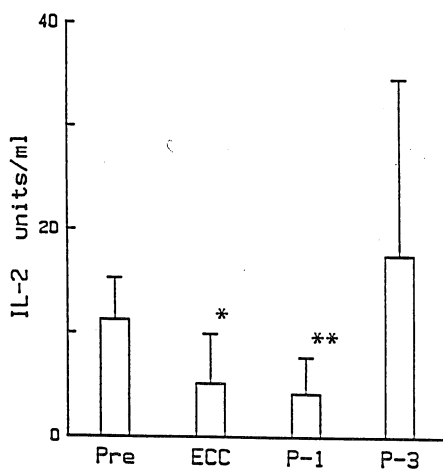


Fig. 6B

Fig. 6. Effects of open heart surgery on IL-1 and IL-2 production.

Pre : preoperative, ECC : post ECC, P-1 : postoperative first day, P-3 : postoperative third day  
All values are mean  $\pm$  S. D.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with preoperative value

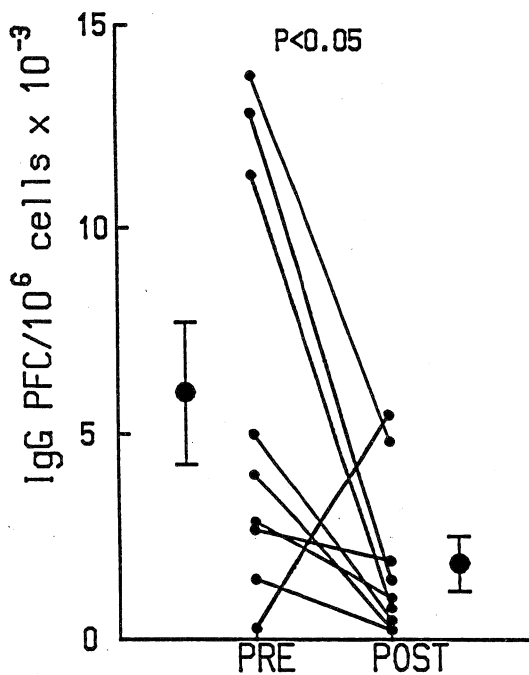


Fig. 7A. Polyclonal IgG antibody production induced by IL-2 during open heart surgery. All values are mean  $\pm$  S. E.

Pre : preoperative, POST : postoperative first day

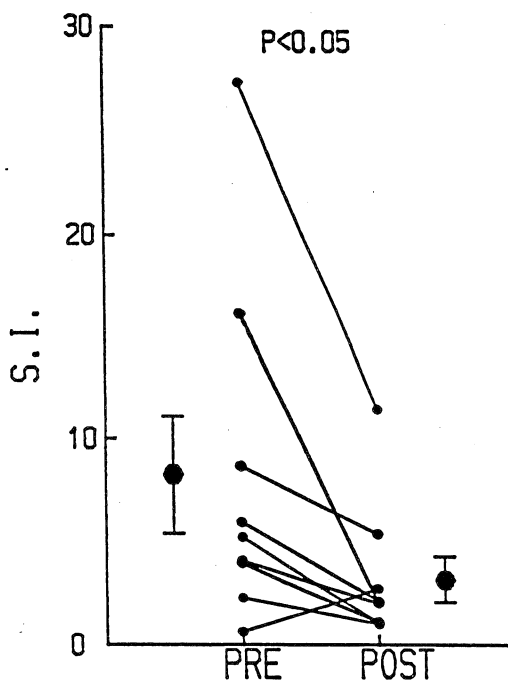


Fig. 7B. Stimulation index of polyclonal IgG antibody production induced by IL-2 during open heart surgery. All values are mean  $\pm$  S. E.

Pre : preoperative, POST : postoperative first day

たものを用いた。S.I.でも術前 $8.31 \pm 2.79$ に比べ術後 $3.29 \pm 1.12$ と有意に低下した ( $P < 0.05$ ) (Fig. 7B).

8) B細胞の IL-2 レセプター陽性細胞出現率

B細胞以外の IL-2 レセプター陽性細胞は開心術により有意に減少した ( $P < 0.05$ ). B細胞で IL-2 レセプター陽性細胞の比率は、開心術により変化しなかった。しかし7例中5例は IL-2 レセプター陽性細胞が消失した。IL-2 レセプターの陰性細胞は変化がみられなかった (Fig. 8A).

9) マイトジェンに誘導されたB細胞の IL-2 レセプター陽性細胞出現率

①PWMに誘導されたB細胞以外の IL-2 陽性細胞は開心術により有意に減少した ( $P < 0.05$ ). B細胞で IL-2 レセプター陽性細胞はマイトジェンの刺激により術前値よりも増加傾向がみられたが、推計学的有意差はなかった。しかし、この中で IL-2 レセプター陽性細胞の多い症例は術後低下傾向を示した。IL-2 レセプターの表出していないB細胞は増加した (Fig. 8B).

②SACにより誘導されたB細胞で IL-2 レセプター陽性細胞を見るとすべて変化はみられなかった (Fig. 8C).

10) 血中のコルチゾール濃度

Fig. 9は血中のコルチゾール濃度をあらわすが、体外循環直後より増加し、術後1日、術後3日も術前に比

較して高値を示した ( $P < 0.01$ ).

IV 考 察

以前より麻酔と外科手術が免疫防御系に影響を及ぼすことは知られている<sup>1)-7)</sup>. 特に開心術に用いられる体外循環により低体温や低血圧などの非生理的な条件やホルモンの変動などがみられ、生体の免疫機能にも大きな影響を及ぼすことが考えられる<sup>8)-15)</sup>. そして体外循環中に血液は希釈や機械的損傷や蛋白の変性などの影響を受け、血中免疫グロブリンや補体が減少することが報告されている<sup>16)-18)</sup>. またモノクローナル抗体の開発によりリンパ球の表面マーカーの解析がなされるようになり、開心術によるヘルパーT細胞<sup>25)-28)</sup>やナチュラルキラー細胞<sup>14)-15)</sup>の減少が報告されている。しかし、リンパ球の表面マーカーの変化は必ずしも機能の変化をあらわさない。一方麻酔薬が免疫機能に与える影響として、マイトジェンに対する芽球化試験の抑制<sup>1)</sup>、食細胞の機能の抑制<sup>29)</sup>、抗体産生能の抑制<sup>30)</sup>が報告されているが、抑制の程度は少ないとされている。本研究では開心術による体液性免疫の変動を調べるためまず血中のIgMとIgGの免疫グロブリン濃度を測定し、体外循環直後から術後3日までともに低下するという従来の報告<sup>12)16)-18)</sup>と同様の結果を得た。その原因として体外循環回路による免疫グロブリンの崩壊や人工心肺充填液による希釈などがあげられ

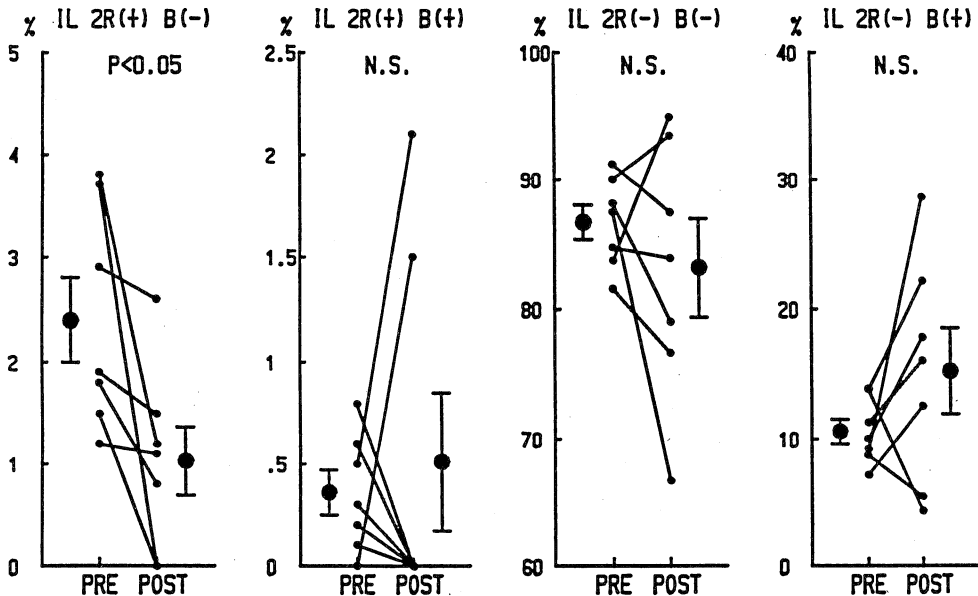


Fig. 8A. Relative population of IL-2R(+) cells in peripheral blood mononuclear cells during open heart surgery. Pre: preoperative, POST: postoperative first day



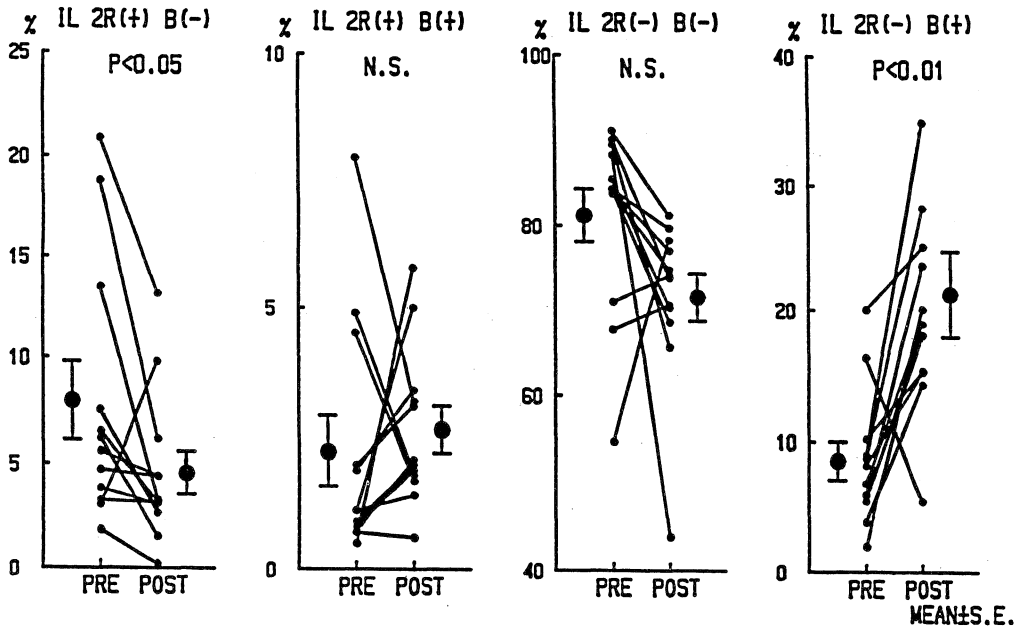


Fig. 8B. Relative population of IL-2R(+) cells in peripheral blood mononuclear cells induced by pokeweed mitogen during open heart surgery.  
Pre: preoperative, POST: postoperative first day

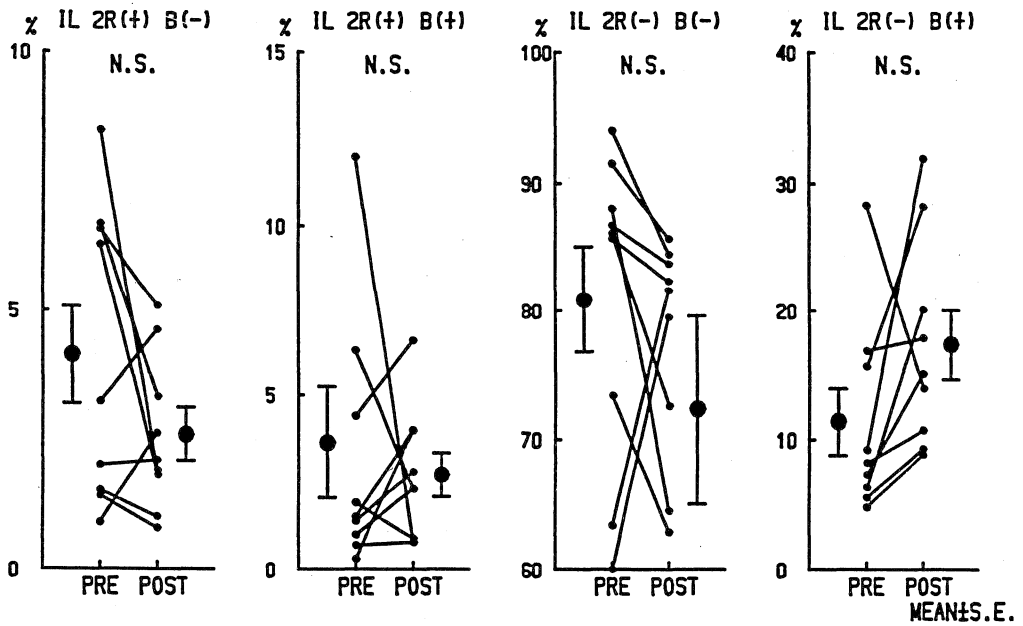


Fig. 8C. Relative population of IL-2R(+) cells in peripheral blood mononuclear cells induced by staphylococcus aureus Cowan 1 during open heart surgery.  
Pre: preoperative, POST: postoperative first day

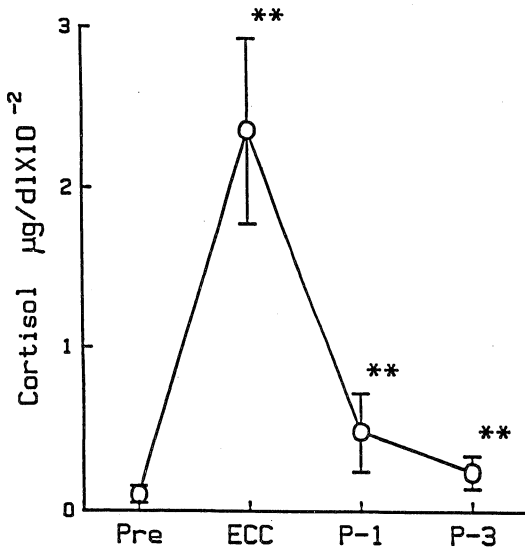


Fig. 9. Changes in serum concentration of cortisol during open heart surgery. All values are mean  $\pm$  S.D. \*\*  $p < 0.01$  compared with preoperative value

る<sup>17)</sup>。しかし血中の免疫グロブリンはすでに産生されたものでありB細胞の機能の変化を示すものではない。感染が生体に与える影響を知るには免疫グロブリンを産生するB細胞の機能を調べることがいっそう重要である。B細胞は抗原刺激などにより活性化され増殖分化し、免疫グロブリンを産生する抗体産生細胞となる<sup>31)</sup>。そのため *in vitro* でB細胞の機能を調べる方法として、B細胞のマイトジェンとリンパ球を培養して1) 培養中の免疫グロブリンの濃度を測定する方法と、2) 抗体産生細胞数の変動を測定する方法が用いられている<sup>32)</sup>。本研究ではB細胞のマイトジェンとしてPWMとSACを用いて、開心術前後におけるマイトジェンに誘導されたPFC数の変動を測定した。PWMに刺激されたIgMとIgGのPFC数を見ると体外循環直後より減少し、術後1日、術後3日とも術前に比べ有意に減少した。一方SACに刺激されたPFC数もIgMとIgGとも体外循環直後から有意に減少した。この結果からB細胞のマイトジェンに誘導されたPFC数は開心術により減少することが確認できた。その原因として1) B細胞の数が減少しているか、2) B細胞の活性化物質に対する反応の低下が考えられた。そこで末梢血中のリンパ球のT細胞とB細胞の比率を調べるとB細胞の割合は術後1日、術後3日とも術前に比べ増加していた。このことからPFC数の減少の

原因として培養に用いたリンパ球のB細胞の数の減少は否定できる。白倉<sup>19)</sup>らやEskola<sup>20)</sup>らは開心術においてリンパ球をB細胞のマイトジェンと培養し、その培養上清の免疫グロブリンの濃度が低下することからB細胞の機能の低下を報告しているが、その原因としてB細胞の数の減少について言及していない。

次にマイトジェンに対するB細胞の反応様式をみると、PWMはT細胞を介してB細胞を賦活するのに対しSACはT細胞を介せず直接B細胞を活性化するとされている<sup>31)</sup>。PFCにより測定したPWMとSACに対するB細胞の反応はともに低下していることからT細胞を介せず直接B細胞の反応性が低下しているものと考えられる。さらにリンパ球芽球化試験の結果からT細胞の活性化物質であるPHAに対する反応は変化せず、SACに対する反応が低下したことにより、B細胞単独の機能低下が強く示唆された。しかし、SACはT細胞も活性化するという報告<sup>33)</sup>もあり、T細胞の影響も否定できない。本研究では開心術により術後PHA反応が低下するという既報<sup>8)11)</sup>と異なり、PHAに対するリンパ球の反応低下がみられなかった。その原因としてSaloの研究<sup>11)</sup>はリンパ球を分離しないで全血を使う方法を用いており、リンパ球数が減少する外科手術後ではPHA反応のカウント値は同じリンパ球数で比較した今回の結果よりも低値となる可能性がある。またRyhaenの実験<sup>8)</sup>では培養に用いたリンパ球が1 ml中 $10^8$ 個と本研究の $10^6$ 個よりも数が少ないためリンパ球の生存率の影響を受けやすく本研究と違った結果が出たのではないかとと思われる。またEskola<sup>20)</sup>らは開心術で測定したリンパ球芽球化試験の変化の中で、患者は既に開心術開始前にストレスのかかった状態で免疫抑制がかかっていたため反応値も低く、反応値も低く、従来の報告<sup>8)11)</sup>よりも術後のPHA反応の低下の割合も少なかったと述べている。

一方 *in vivo* における抗体産生で開心術後3日目にみられた末梢血のPFC数の増加の原因については不明であるが、B細胞の体内分布の変動が考えられる。マイトジェンに誘導されたPFC数が減少していることやB細胞の寿命から考えると開心術によりT細胞が末梢血から骨髓やリンパ組織や脾臓に移動した結果、相対的に末梢血中にB細胞と形質細胞が増加したためではないかと推察された。

次にB細胞の機能低下の原因について考えるとその1つとして血中のコルチゾールの上昇があげられる。正常人でコルチゾールを投与した研究<sup>34)</sup>によるとコルチゾール投与後リンパ球と単球の減少は投与4時間から6時間で最大となり、24時間でもとに戻る。またそのときのリ

ンパ球の増殖反応で Con A や PWM に誘導された反応は抑制されるが、PHA 反応は抑制されず、その抑制も 24 時間以内に投与前まで回復すると報告されている。今回測定した血中のコルチゾールの濃度は体外循環直後の急激な上昇後、術後低下傾向にあるが、術前値より高かった。そのため術後 B 細胞の割合が増加しているにもかかわらず、コルチゾールにより B 細胞の分化増殖が阻害され PFC 数が減少した可能性がある。しかし、Eskola<sup>20)</sup>らは開心術においてコルチゾールを添加したリンパ球の培養実験をおこない、その中で B 細胞の機能低下の原因はステロイドにより賦活されるサブプレッサー T 細胞の作用によるものではないと述べている。また Roth<sup>12)</sup>らも開心術後血中のコルチゾール濃度が上昇傾向にあるにもかかわらずリンパ球芽球化試験が増強する傾向にあることからリンパ球の機能低下の原因はステロイドではないと報告している。このように開心術におけるリンパ球の機能低下の原因としてコルチゾールの主要な関与は否定的である。

次にこの B 細胞の機能低下に対して T 細胞とサイトカインとの関係について解析する。B 細胞が増殖して抗体産生細胞に分化、成熟するためには T 細胞の協力が必要である。その T 細胞のヘルプの仕方に 1) 細胞間接触が必要な MHC 拘束性のものと 2) サイトカインを主とした可溶性因子仲介によるものがあり、T 細胞は細胞性免疫のみならず抗体産生にも重要な役割を果たしている<sup>31)35)</sup>。

今回の結果は開心術において T 細胞数は体外循環直後から減少し、CD4 陽性細胞 (Leu 3a) / CD8 陽性細胞 (Leu 2a) 比が体外循環直後から低下することからその減少の主因はヘルパー T 細胞の減少であるという従来の報告<sup>25)~28)</sup>を支持するものである。井手<sup>20)</sup>らはそのヘルパー T 細胞の減少の原因は不明であるが、体外循環によるリンパ球の寿命の短縮やリンパ器官への移行が T 細胞のサブセットによって差があるためと推測している。さらにコルチゾール値とヘルパー T 細胞 / リンパ球比やヘルパー T / サプレッサー T との変動に相関がみられないため、コルチゾールの上昇とヘルパー T 細胞の減少には関係がないと報告している。本研究でみられた開心術後のヘルパー T 細胞の著明な減少は細胞間接触が必要な MHC 拘束性の B 細胞の分化を低下させ、その結果として抗体産生を低下させる可能性があると考えられた。

一方抗体産生に関係しているサイトカインは IL-1 や IL-2 の他に IL-4, IL-5, IL-6 がある<sup>23)</sup>。その中で IL-1 は IL-1 $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の 2 種類があり、単球やマクロファージ系の細胞に由来し、様々な生物活性を有する蛋白

質である。B 細胞に対しては活性化される過程で G1 期から S 期へ移行する時期に作用し、分裂の増進と分化を促進する<sup>22)</sup>。IL-1 自身でも B 細胞の分化を誘導して抗体産生を惹起させることも知られている。また T 細胞に対して IL-2 を介して T 細胞の分裂を増幅し、IL-2 レセプターを発現させ、リンホカインの産生を促す。Cavaillon<sup>36)</sup>は開心術時にリンパ球の細胞内の IL-1 の測定をおこない、その産生に低体温や補体の活性化が関係し、術後 24 時間で最低となると報告しているが、本研究では IL-1 の産生能に変化はみられなかった。その結果が異なった原因として、今回の研究ではリンパ球から上清に放出された IL-1 を測定しているが、彼らは細胞内の IL-1 を測定しているためと考えられた。今回の結果から開心術による抗体産生の低下と単球の IL-1 産生能との関連は少ないと考えられた。

次に IL-2 について検討を加える。IL-2 は T 細胞増殖因子ともよばれ、T 細胞表面に存在する受容体と相互作用し、T リンパ球の増殖を誘導する働きのあるリンホカインである。また IL-2 は主として T 細胞から分泌され、B 細胞に直接ではなくヘルパー T 細胞の存在のもとに IL-5 や IL-6 を放出させて免疫グロブリンの産生を誘導する<sup>37)</sup>。IL-2 は活性化された B 細胞の増殖分化を誘導したり、活性化されたキラー細胞の生成やナチュラルキラー細胞と細胞障害性 T 細胞の活性誘導を引き起こす。そして成熟型 T 細胞 (主としてヘルパー T 細胞) のみが、マイトジェンや抗原による刺激を受けて IL-2 を産生する<sup>38)</sup>。本研究でみられた IL-2 産生能の低下はヘルパー T 細胞数の減少が一義的に IL-2 産生能を低下させているかもしれないが、ヘルパー T 細胞の機能低下も否定できない。井手<sup>39)</sup>らは体外循環時のリンパ球の IL-2 産生能について術後 7 日まで低下することを報告し、その中で最も産生能が低下するのは体外循環後でないことや IL-2 産生能と体外循環時間と正の相関を示すことから体外循環の直接の抑制ではないと述べている。Hisatomi<sup>40)</sup>らも開心術により IL-2 産生能が低下することを確認しているが、その低下の程度は疾患の重症度や輸血量に相関していると述べている。Wood<sup>41)</sup>らは熱傷の患者で抗体産生と IL-2 の関係について研究をおこない、その中で T 細胞の IL-2 産生能が正常人に比べてあきらかに低下し、同時に測定したテタヌスに対する抗体産生も低下していることから抗体産生の低下は IL-2 の産生能低下に関係していると述べている。いずれにしても単核球の IL-2 産生能低下は可溶性因子仲介による B 細胞の分化成熟を低下させる可能性があると考えられた。

次に開心術によるB細胞の機能低下の原因としてB細胞のIL-2に対する反応性について検討した。活性化されたB細胞の細胞表面にもIL-2レセプターが存在し、そのレセプターはモノクローナル抗体で同定され、T細胞に表出するのと同様であるといわれている<sup>42)</sup>。IL-2は細胞表面のIL-2レセプターと結合し細胞を活性化するため、細胞表面のIL-2レセプターを調べることが重要となる。開心術により末梢血中のB細胞でIL-2レセプター陽性の細胞数に変動が見られなかったことから recombinant IL-2 に誘導されたIgGのPFC数が減少した原因として培養中のIL-2レセプター陽性細胞の減少は否定できる。またPWMやSACに誘導されたB細胞でIL-2レセプター陽性細胞に変動がみられなかったことからIL-2に対するB細胞の低下の機序としてIL-2レセプター陽性細胞の減少によるものではなく、IL-2レセプターからのシグナルの伝達作用低下の存在が推測される。

以上本研究でみられた開心術後のB細胞の機能低下による感染対策に従来の抗生物質や免疫グロブリン製剤の投与だけでは耐性菌の出現など問題があり、抗体産生を増強するパロチン<sup>43)</sup>やレバミゾール<sup>44)</sup>などの安全な免疫賦活剤の応用が望まれる。

## V 結 論

本研究では開心術によるB細胞の機能の変化について in vitro と in vivo における抗体産生を測定し、B細胞に影響を与えるサイトカインとの関連について以下の結論を得た。

1. 開心術によりB細胞の活性化物質であるSACとPWMに誘導された抗体産生細胞は減少し、同時におこなったリンパ球芽球化試験でSACとPWMの反応も低下したことからB細胞の機能低下が認められた。
2. 開心術にみられるT細胞数の減少は、CD4陽性細胞/CD8陽性細胞比が低下することからその主因はヘルパーT細胞の減少による。
3. 開心術により単球のIL-1産生能は変化しないが、単核球のIL-2産生能は低下する。
4. 開心術により外因性のIL-2に対するB細胞の反応低下が認められるが、B細胞のIL-2レセプター陽性細胞の減少とは関連しない。
5. 開心術後の抗体産生能低下による感染症対策に抗生剤や免疫グロブリン製剤の投与の他に安全な免疫賦活剤の応用が望まれる。

本論文の要旨は第14回日本集中治療医学会(1987山

口)、第35回日本麻酔学会(1987東京)、第16回日本集中治療医学会(1989旭川)において発表した。

稿を終えるに臨み、始終御懇篤なる御指導、御校閲を賜った奥田孝雄教授に深甚の謝意を捧げるとともに、御助言、御校閲を賜った第3外科学教室北村惣一郎教授及び第3内科学教室辻井正教授に深謝致します。また、本研究の遂行にあたり御指導、御助言をいただいた第3内科学教室石坂重昭講師、ならびに御協力いただいた麻酔科学教室及び第3外科学教室の諸兄に心から感謝します。

## 文 献

- 1) Cullen, B. F. and van Belle, G.: Lymphocyte transformation and changes in leucocyte count: effect of anesthesia and operation. *Anesthesiology* 43: 563, 1975.
- 2) Moudgil, G. C. and Wade, A. G.: Anesthesia and immunocompetence. *Br. J. Anaesth.* 48: 31, 1976.
- 3) Duncan, P. G. and Cullen, B. F.: Anesthesia and immunology. *Anesthesiology* 45: 522, 1976.
- 4) Walton, B.: Effects of anaesthesia and surgery on immune status. *Br. J. Anaesth.* 51: 37, 1979.
- 5) 徳富康男・無敵剛介・松元康治・大久保慶二・横山三男: 麻酔の免疫系への影響—リンパ球のサブポピュレーションの変動について。 *麻酔* 32: 1523, 1983.
- 6) Cooper, A. I.: Depression of immunological responses due to surgery. *Immunology* 27: 393, 1974.
- 7) Slade, M. S., Simmons, R. L., Yunis, E. and Greenberg, L. J.: Immunodepression after major surgery in normal patients. *Surgery* 78: 363, 1975.
- 8) Ryhanen, P., Herva, E., Hollen, A., Nuutinen, L., Pihlajaniemi, R. and Saarela, E.: Changes in peripheral blood leukocyte counts, lymphocyte subpopulations, and in vitro transformation after heart valve replacement. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 77: 259, 1979.
- 9) 早瀬修平・清水一之・阿部稔雄・弥政洋太郎・井上昭一・杉田洋一・酒井正生: 体外循環下開心術の感染防御機構に及ぼす影響。 *日胸外会誌* 30: 52, 1982.
- 10) Hairston, P., Manos, J. P., Graber, C. D. and Lee, W. H.: Depression of immunologic surveillance by pump-oxygenation perfusion. *J. Surg. Res.* 9: 587, 1969.
- 11) Salo, M.: Effect of anaesthesia and open-heart surgery on lymphocyte responses to phyto-

- haemagglutinin and concanavallin A. Acta Anaesth. Scan. 22: 471, 1978.
- 12) Roth, J. A., Golub, S. H., Cukingnan, R. A., Brazier, J. and Morton, D. L.: Cell mediated immunity is depressed following cardiopulmonary bypass. Ann. Thorac. Surg. 31: 350, 1981.
- 13) van Velzen-Blad, H., Dijkstra, Y. J., Heijen, C. J., Schurink, G. A., Zegers, B. J. M. and Balieux, R. E.: Cardiopulmonary bypass and host defence functions in human beings: lymphocyte function. Ann. Thorac. Surg. 39: 212, 1985.
- 14) Ryhanen, P., Huttunen, K. and Ilonen, J.: Natural killer cell activity after open-heart surgery. Acta Anaesthesiol. Scand. 28: 490, 1984.
- 15) Tonnesen, E., Brinklov, M. M., Christensen, N. J., Olesen, A. S. and Madsen, T.: Natural killer cell activity and lymphocyte function during and after coronary artery bypass grafting in relation to the endocrine stress response. Anesthesiology 67: 526, 1987.
- 16) Parker, D. J., Cantrell, G., Stroud, R., Karp, R. and Digerness, S. B.: Changes in Serum Complement and the Immunoglobulins after Cardiopulmonary Bypass. Brit. J. Surg. 59: 910, 1972.
- 17) Ryhanen, P., Leinonen, M., Koskela, M., Hollmen, A., Nuutinen, L., Pihlajaniemi, R. and Saarela, E.: Are changes in serum immunoglobulin and complement levels following open heart surgery influenced by oxygenator type or postoperative parenteral nutrition? Ann. Clin. Res. 11: 9, 1979.
- 18) 坪 敏仁・Oka Yasu・松本明知・尾山 力: 開心術中, 術後における血清免疫グロブリンおよび補体の変動. 麻酔 34: 221, 1984.
- 19) 白倉良太・山崎芳郎・門田康正・広瀬 一・中田精三・籠谷勝己・森 隆・川島康生: 手術侵襲と免疫機能 術後の一過性免疫機能低下. 臨床免疫 14: 331, 1982.
- 20) Eskola, J., Salo, M., Vilja, M. K. and Ruuskanen, O.: Impaired B lymphocyte function during open heart surgery: effects of anaesthesia and surgery. Br. J. Anaesth. 56: 333, 1984.
- 21) Gronowicz, E., Coutinho, A. and Melchers, F.: A plaque assay for all cells secreting Ig of a given type or class. Eur. J. Immunol. 6: 588, 1976.
- 22) Gordon, J. and Grame, R. G.: The molecules controlling B lymphocytes. Immunol. Today 8: 339, 1987.
- 23) 寺西 強: B細胞の分化, 増殖に関与するサイトカイン. 臨床免疫 20: 1, 1988.
- 24) Gillis, S., Ferm, M. M., Ou, W. and Smith, K. A.: T cell growth factor: Parameters of production and quantitative microassay for activity. J. Immunol. 120: 2027, 1976.
- 25) 富樫賢一・中込正昭・江口昭治・青木定夫・田中いずみ・品田章二: 開心術後早期の免疫動態の研究—モノクローナル抗体を用いてのリンパ球亜群の解析を中心に. 日胸外会誌. 33: 2052, 1985.
- 26) 井手博文・垣内史堂・古田直樹・松本博志・須藤憲一・古瀬 彰・浅野献一: 体外循環のT細胞に及ぼす影響について. 日胸外会誌. 35: 1089, 1987.
- 27) 久富光一・磯村 正・川良武美・赤川治夫・柳 泉・島 弘志・青柳成明・小須賀健一・大石喜六: 開心術後の細胞性免疫能の変動—体外循環時間により分類した3群間の比較検討. 日胸外会誌. 35: 1112, 1987.
- 28) 村山祐一郎・山岸久一・神吉 豊・和田行雄・白方秀二・大賀興一・細川豊史・岡 隆宏: 開心術における細胞性免疫動態—リンパ球の functional subsets の変動. 日胸外会誌. 36: 8, 1988.
- 29) Cullen, B. F., Hume, R. B. and Chretien, P. B.: Phagocytosis during general anesthesia in man. Anesth. Analg. 54: 501, 1975.
- 30) 柳川史忠: 各種吸入麻酔薬の免疫産生に及ぼす影響. 麻酔 25: 558, 1976.
- 31) Jelinek, D.F. and Lipsky, P.E.: Regulation of Human B Lymphocyte Activation, Proliferation, and Differentiation. Advances in Immunology (Dixon, F. J., ed.). Vol. 40, Orlando, Academic Press, pl, 1987.
- 32) Severinson, E. and Larsson, Eva-Lotta.: in Handbook of experimental immunology (Weir, D. M., Herzenberg, L. A., Blackwell, C. and Herzenberg, L. A., eds.). fourth ed., Vol. 2, Blackwell Scientific Publication, Oxford, Great Britain, p62~66, 1986.
- 33) Schuurman, R. K. B., Gelfand, E. W. and Dosch, H. M.: Polyclonal activation of human lymphocytes in vitro. J. Immunol. 125: 820, 1980.
- 34) Fauci, A. S. and Dale, D. C.: The effect of in

- vivo hydrocortisone on subpopulations of human lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **53**:240, 1974.
- 35) **Miedema, F. and Melief, C. J. M.** : T-cell regulation of human B-cell activation. *Immunology Today* **6** : 258, 1985.
- 36) **Cavaillon, N. H., Rousselier, N., Ponzio, O., Carreno, Marie-Paule., Laude, M., Carpentier, A. and Kazatchkine, M. D.** : Induction of interleukin-1 production in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **98** : 1100, 1989.
- 37) **Nakagawa, T., Hirano, T., Nakagawa, N., Yoshizaki, K. and Kishimoto, T.** : Effect of recombinant IL-2 and  $\gamma$ -INF on proliferation and differentiation of human B cells. *J. Immunol.* **134** : 959, 1985.
- 38) **Greene, W. C. and Leonard, W. J.** : The human interleukin-2 receptor. *Ann. Rev. Immunol.* **4** : 69, 1986.
- 39) 井手博文・垣内史堂・井野隆史・長谷川嗣夫・古田直樹・松本博志・古瀬 彰 : 開心術症例におけるリンパ球幼弱化反応抑制の機序について. *日胸外会誌.* **37** : 1526, 1989.
- 40) **Hisatomi, K., Isomura, T., Kawara, T., Yamashita, M., Hirano, A., Yoshida, H., Eriguchi, N., Kosuga, K. and Ohishi, K.** : Changes in lymphocyte subsets, mitogen responsiveness, and interleukin-2 production after cardiac operations. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **98** : 580, 1989.
- 41) **Wood, J. J., O'Mahony, J. B., Rodrick, M. L., Eaton, R., Demling, R. H. and Mannick, J. A.** : Abnormalities of antibody production following thermal injury: An association with reduced interleukin 2 production. *Arch. Surg.* **121** : 108, 1986.
- 42) **Mingari, M. C., Gerose, F., Carra, G., Accolla R. S., Moretta, A., Zubler, H., Waldmann, T. A. and Moretta, L.** : Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. *Nature* **312** : 641, 1984.
- 43) **Ishizaka, S. and Sugawara, I.** : Polyclonal antibody production induced by parotid protein and its active glycopeptide in mouse and human lymphocytes. *Immunopharmacology* **6** : 133, 1983.
- 44) **Symoens, J. and Rosenthal, M.** : Levamisole in the modulation of the immune response: The current experimental and clinical state. *J. Reticuloendothel. Soc.* **21** : 175, 1977.