

橋本病 Basedow 病患者の細胞性免疫に関する研究

第一編

MIF 及びリンパ球芽球化反応の検討

岡山大学医学部第三内科学教室 (主任: 大藤真教授)

竹久義明

[昭和51年4月9日受稿]

I 緒言

橋本病は代表的自己免疫疾患のひとつと考えられており、近年細胞性免疫の異常と本疾患の病因との関係が追求されている^{1,2,3}。また橋本病とバセドウ病は合併⁴したり移行する症例があることより、病因の類似性が推測されている。

ところでこれら甲状腺疾患における細胞性免疫については、感作リンパ球が抗原刺激を受けて産生する白血球遊走因子をみる方法 leucocyte migration inhibition test (LMIT と略す) により、Søborg は橋本病患者末梢リンパ球が thyroid antigen に感作されていることを報告し、また Wartenberg⁵ は甲状腺 microsome 分画に感作されていることを報告した。同様に産生される芽球化因子, nonspecific mitogen である PHA による芽球化現象では、DeGroot⁶ は橋本病, バセドウ病とも正常対照群と差がないことを示し、Ehlenfeld⁷ は正常範囲内ではあるが、機能亢進症では芽球化率が高く、機能低下症では低いことを述べている。本邦では深瀬⁸ は LMIT で橋本病, バセドウ病の末梢リンパ球は, thyroglobulin, 甲状腺 microsome 分画に感作されていることを示し、大滝⁹ は橋本病患者では PHA による芽球化率が低いことを報告している。

一方 Bloom¹⁰ は細胞性免疫の in vitro の検査に用いられる LMIT は cytophilic antibody や antigen antibody complex の好中球膜面への結合など humoral antigen の関与が完全には否定しえないことを指摘しており、また臨床所見との関係については見解に乏しい。

そこで著者は David¹¹ らのモルモット腹腔マクロ

ファージの遊走を指標にした MIF test 間接法と PHA による芽球化現象で、橋本病, バセドウ病の細胞性免疫を検査し、臨床所見をあわせ検討して 2-3 の知見を得たので報告する。

III 検査対象ならびに方法

(1) 対象

対象となった患者は岡山大学第三内科に入院中および外来通院中の患者で、甲状腺腫の性状、抗 thyroglobulin 抗体 (TRC と略す) により疑診をつけ、open biopsy, needle biopsy, aspiration biopsy などにより診断が確定した橋本病患者 53 名、甲状腺機能、¹³¹I uptake, scintigram, BMR, 臨床症状により診断が確定したバセドウ病患者 29 名、いずれも治療中、および正常対照人 16 名である。

(2) リンパ球分離培養方法 (表 I)

ヘパリン 500 単位を加えた静脈血 50 ml を採血し、それに 6% Dextran 5 ml を混和した後、37°C 1 時間垂直に静置し、分離した上清を内径 1.5 mm のシリコンチューブを介して cotton column に移す。ついでそれを 10 分間室温に静置した後、Hank's BSS でゆっくりリンパ球を洗い出し、さらにこれを TC 199 で 1500 rpm 5 分間 3 回遠沈洗滌し、最終的には TC 199 でリンパ球数を 3×10^6 ヶ/ml に浮遊した。得られた白血球は 90% 以上がリンパ球であり、好中球の混入は少く、tripanblue による染色では 95% 以上が viable cell であった。MIF test にはそのリンパ球浮遊液を各培養試験管に 2 ml ずつ入れ、抗原添加 (甲状腺 microsome 分画は 100~500 μ g wet weight/ml, thyroglobulin は 100 μ g/ml) または非添加のもとに、37°C 5% CO₂ air 中で 24 時間培養し、4

表1. Method of Lymphocyte Culture

Draw 50ml of heparinized whole blood by venipuncture.
Add 5ml of 6% Dextran and mix thoroughly.
Allow to sediment RBC at 37°C for 30min.
Remove the leucocytes-rich plasma and place on cotton column and incubate for 10 min at room temperature.
Wash off the lymphocytes with 50ml of Hanks' BSS and wash 3times with medium TC-199.
Resuspend the isolated lymphocytes in TC-199 to contain 3×10^6 cells/ml.
Two ml of lymphocyte suspensions in each tube are incubated with or without antigen at 37°C for 24hours.
After incubation, cells are centrifuged at 3000 rpm for 30 min at 4°C.
Resulting supernatants are used for MIF assay.

表2. Method of migration Inhibition Test.

Thirty ml of paraffin oil injected intraperito neally into guinea pigs.
After 4 days, peritoneal exudates are removed and washed 3 times with medium TC-199.
Resuspend the final exudate cell pellets. in 3 volumes of medium TC-199.
Exudate cell suspensions are placed in capillary tubes and centrifuged at 800 rpm for 5 min.
Capillary tubes are cut at cell-fluid interface and fixed onto cover glass in Petri dish.
MIF supernatants with 20% horse serum are added on tubes and another cover glass placed on them.
Incubated at 37°C for 24 hours in the atmosphere containing 95% air and 5% CO ₂ .
Area of cell migration are photographed and measured by planimetry.
Migration index calculated as follow :
M. I. (%) = $\frac{\text{average area of migration with antigen}}{\text{average area of migration without antigen}} \times 100$

℃3000 rpm 30分間遠沈して上清を分離し、-20℃に保存して1週間以内にMIF assayに用いた。cotton columnは30ml注射器外筒にcotton 4gを中心部より壁に向かって均等につめ、これにゴム栓をして、autoclaveで滅菌し作製した。またHank's BSSでcolumnを洗う速度は、columnにつけた21G1/2針より出る液の滴数が確認できる程度にとどめた。columnをつくるとき壁に面した部位をおさえてcottonをつめたり、columnを洗う速度が早すぎると好中球の混入率が増した。上清が少くcolumn先端まで入らないときは、10分間室温に静置する前にHank's BSSを追加し、全体に細胞浮遊液がゆきわたるようにした。

(3) PHAによる芽球化現象

(2)の方法により得た細胞浮遊液をTC 199で2倍に稀釈して細胞数を 1.5×10^6 1mlにし、calf serumを15%の濃度になるよう加えて、その2mlを各培養試験管に分け、PHA-M(Difco社製)は5mlに溶解してその0.1mlを加えて、37°C 5% CO₂ air中で、72時間培養した後、1500rpm 5分間遠沈して、沈渣の塗末標本をつくり、May-Giemsa染色した。そして光学顕微鏡で、形態学的にPiknoseをおこしてな

く、胞体が濃染して明らかな核小体が認められる大型細胞を芽球化細胞とし、細胞を1000個数えて全体にしめる割合を芽球化率としてあらわした。細胞が集塊をつくり、個々の細胞が判定しにくい場合があったが、そのときはこれを除外し、また先入観を防ぐため、患者の氏名はふせ、番号により鏡検判定を行った。

(4) MIF testの方法(表2)

200~300gのモルモットの腹腔に30mlの流動パラフィンを注入し、4日後、腹腔内への出血を防ぐ目的で、pentobarbital麻酔下に頸動脈切断で脱血し、ついで無菌的に開腹して、100mlのHank's BSSで浸出せる細胞をよく洗いながら洗滌液を分液ロートにとり、攪拌した後30分間静置し、上層の流動パラフィンを残してマクロファージの存在する下層を分離し、medium TC 199で1300rpm 5分間3回遠沈洗滌した。そして得られた細胞浮遊液(約90%のマクロファージを含む)に一端を閉鎖した内径1.45mmのヘマトクリット管20~30本を入れ、全体を減圧した後、徐々に大気圧にもどして毛細管につめ、800rpm 5分間遠沈して細胞を一端に集め、さらに細胞と液の境界よりやゝ細胞よりの部位でこれを切断し、

シリコングリースで24×24mmのカバーガラスの中央部に2本平行に固定した。これを滅菌シャーレ(10×25mm)に入れ、次に前もって(2)の方法で得た MIF assay 用のリンパ球培養上清に15%の濃度になるよう馬血清を加えて medium とし、これをマクロファージをつめた毛細管上に約0.8ml 加え、その上を同じサイズのカバーガラスでおおい、37℃ 5%CO₂air 中で24時間培養した。遊走面積の測定は毛細管の断端より遊走したマクロファージの拡がり写真をとり、4倍に拡大してプラメニーターで測定し、抗原添加したものの遊走面積を非添加のもの面積で割った値の100倍を migration index (%) とした。毛細管の切断はリンパ球の培養上清を加える直前に行うことが大切で、断端の乾燥によりみかけ上の遊走阻止がみられた。

(5) 抗原作製方法

バセドウ病の手術で摘出した甲状腺組織を0.9% NaCl 中で細切洗滌し、ガーゼで濾過して水分を除き、その組織重量の約4倍量の cold 0.25M sucrose を加え、冷却しながら homogenizer (日本精機製 Blade Homogenizer) で2分間 homogenize し、再びガーゼで濾過し、濾液を teflon homogenizer で homogenize した。その homogenate を4℃ 800g 10分間遠沈し、沈渣を再度0.25M sucrose に浮遊し2回の遠沈の上清を合せて10000g 20分間遠沈、上清をさらに105000g 60分間遠沈し microsome 分画を得た。thyroglobulin は富士臓器より提供を受けた human purified thyroglobulin を使用し、変性 thyroglobulin はそれを56℃ 30分間加熱して作製した。

(6) その他

TRC は thyroid test kit、甲状腺機能は¹³¹I-T₄ resin sponge uptake, tetrasorb 法による血中 total thyroxin により測定した。¹³¹I 甲状腺摂取率は脱ヨード食を1週間続けた後、¹³¹I 50~100 μC を投与し、24時間後に測定した。

III 結 果

(1) PHA-Mによる末梢リンパ球の反応性の検討

PHA-Mによる末梢リンパ球の芽球化率(図1)は、橋本病26例では52~11% 平均32.5±11.2(S.D.)%, バセドウ病11例では41~63%, 平均49.0±7.6%, 正常対照者14例では32~63%, 平均49.4±8.1%で、正常対照者平均-2SDの33%以下の異常低下反応を示したものは、橋本病では26例中14例、54%であったのに対して、バセドウ病では正常対照群

との間に有意差は認められなかった。

(2) 甲状腺 microsome 分画, thyroglobulin による末梢リンパ球の MIF test についての検討
thyroglobulin による末梢リンパ球の MIF 産生(図2)は、橋本病患者38例では、73~120%, 平均98.5±12.2(SD)%, バセドウ病患者20例では54~132% 平均93.0±18.3%, 正常対照者16例では84~115%, 平均98±9.6%で、正常対照者平均-2SDの78%以下を

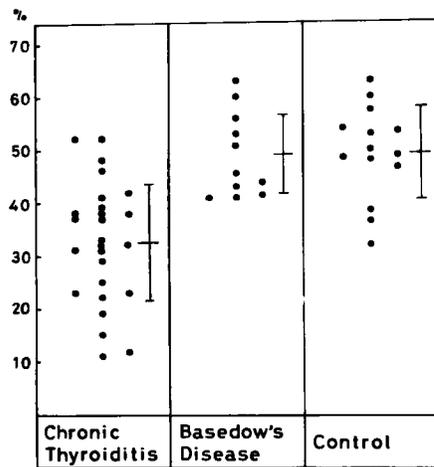
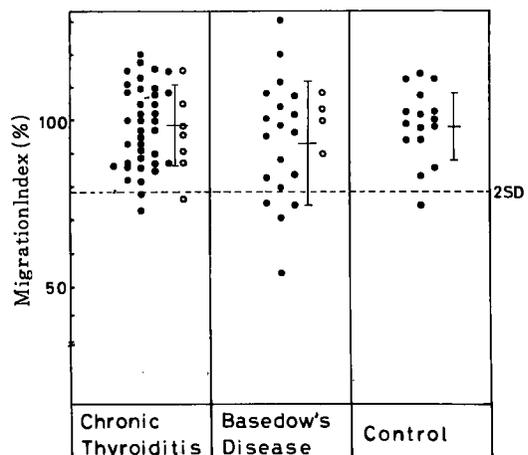


図1 Blastogenesis of Lymphocytes in Response to PHA.



• Heat denatured thyroglobulin

図2 MIF Production in Response to Thyroglobulin. Blastogenesis

抑制とすると、橋本病3例、内1例は加熱変性 thyroglobulin, パセドウ病4例、正常対照者1例に遊走阻止がみられたが、3者の間には有意差はみとめられなかった。

甲状腺microsome 分画による末梢リンパ球のMIF産生(図3)は、橋本病患者40例では38~124%, 平均 85.6 ± 19.5 (SD)%, パセドウ病患者15例では平均 96.6 ± 8.2 %, 正常対照者18例では平均 97.6 ± 10.1 %で、正常対照者平均-2SDの77.4%以下を抑制とすると、橋本病では12例、30%に、パセドウ病では1例がMIF test 陽性であり、橋本病では遊走阻止が認められる症例が有意に増加していた。

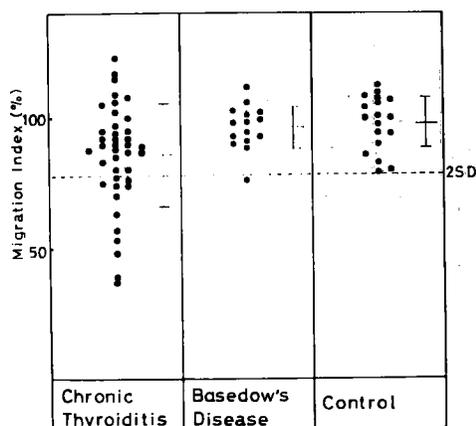


図3 MIF Production in Response to Thyroid Microsomal Fraction.

(3) 臨床所見とMIF test, PHAによる芽球化率との関係についての検討(表3)。

これら諸検査の対象とした橋本病患者は53名であり、表3に示す如く年齢は12才より69才にわたり、平均年齢は44才であった。年齢とMIF test, PHAによる芽球化現象の関係は表4に示すように、20才まで、それ以後10才ごとに61才以上まで分けて検討したが、一定の傾向は認められなかった。

甲状腺腫発見よりの期間は、甲状腺腫が小さくて自覚してなかったものから30年に及ぶものまであったが甲状腺腫発見からの期間と甲状腺microsome分画によるMIF test, PHAによる芽球化現象との関係は表5に示す如く、1年以内、その後は5年ごとに16年以上までを分けて検討したが、一定の傾向はみられなかった。

また七条の分類で甲状腺腫をgrade IからGrade

Vに分け、各症例につき甲状腺microsome分画によるMIF test, PHAによる芽球化現象との関係を検討したが、表6に示す如く一定の傾向はみられなかった。

表4. Correlations between Age and MIF Production in Response to Thyroid Microsomal Fraction, and Blastogenesis of Lymphocytes in Response to PHA in Patients with Chronic Thyroiditis.

Age	MIF(+)	MIF(-)	PHA(+)	PHA(-)
~20	2	2	0	1
~30	0	5	2	0
~40	1	5	2	3
~50	2	8	4	4
~60	4	7	3	2
61~	3	1	3	2

n. s.

表5. Correlations between Duration of Struma and MIF Production in Response to Thyroid Microsomal Fraction, and Blastogenesis of Lymphocytes in Response to PHA in Patients with Chronic Thyroiditis.

Duration of Struma	MIF(+)	MIF(-)	PHA(+)	PHA(-)
~1year	4	8	6	2
~5	2	9	2	6
~10	1	7	2	2
~15	1	1	0	1
16~	3	2	3	0

n. s.

表6. Correlations between Struma Grade and MIF Production in Response to Thyroid Microsomal Fraction, and Blastogenesis of Lymphocytes in Response to PHA in Patients with Chronic Thyroiditis.

Struma Grade	MIF(+)	MIF(-)	PHA(+)	PHA(-)
I	3	0	1	1
II	0	5	3	1
III	6	12	5	4
IV	1	13	3	2
V	2	7	1	4

n. s.

さらにneedle biopsy, あるいはopen biopsyを施行しえた症例では、diffuse thyroiditisとfocal thyroiditisに分類し、甲状腺microsome分画によ

表 3. Data in Patients with Chronic Thyroiditis.

No	Age	Duration of Struma	Struma Grade	Histology Diffuse Focal	BSG mm/hr-	T ₃ RSU	total T ₄	T ₄ value	¹²⁵ I up/24h	BMR	Serum γ -gl/dl	TRC	mic.MIF	thygl.MIF	PHA Blastogenesis	Complication
1	64	2 M	III	D	16	26.7	9.7	2.59	41.3	-	1.5	(-)	77	93	-	
2	47	3 Y	V	D	15	28.8	3.7	1.07	-	-	2.7	10 ³	76	102	48	
3	58	22 Y	IV	F	10	19.4	6.4	1.24	3.1	-	1.9	10 ³	75	86	-	
4	52	-	I	D	11	20.1	2.2	0.44	16.2	-31	2.2	10 ⁴	74	86	-	
5	56	16 Y	III	D	7	26.0	10.8	2.81	28.0	-	1.6	10 ⁴	74	-	11	
6	51	6 Y	III	D	-	22.2	9.8	2.17	36.7	+5	1.8	(-)	70	91	42	
7	15	11 Y	III	F	-	22.5	5.8	1.31	56.4	-14	-	10 ³	63	-	46	
8	69	30 Y	V	D	57	19.5	3.5	0.68	16.3	-	2.3	(-)	57	73	12	D. M
9	38	5 Y	I	F	12	25.7	7.3	1.88	28.9	+2	1.7	10 ³	53	7	37	
10	61	1 Y	III	D	13	28.4	9.3	2.64	34.1	-	1.8	(-)	48	93	-	D. M
11	17	1 Y	I	F	10	32.6	12.8	4.17	-	-	1.5	10 ³	39	109	-	
12	42	1 Y	III	D	9	15.7	5.0	0.79	71.7	-	1.4	10 ³	38	-	-	Pseudoxantoma Elasticum
13	19	10 Y	V	-	9	24.0	2.9	0.69	78.8	-	-	10 ⁴	123	118	-	3 out of 4 sisters Struma
14	24	3 Y	IV	F	14	29.0	7.6	2.20	50.9	-	2.2	(-)	117	110	-	3 years before Basedow
15	56	7 Y	IV	D	-	25.9	11.5	2.98	32.6	+3.5	1.8	10 ³	115	113	-	
16	40	2 Y	V	D	16	21.3	5.7	1.21	50.7	-5	1.9	10 ⁴	109	105	41	
17	46	3 Y	IV	F	7	27.2	9.6	2.61	78.6	-10	-	10 ³	108	110	-	
18	59	17 Y	III	F	15	21.7	4.8	1.04	42.9	+3	2.3	10 ⁴	106	111	-	
19	38	-	II	F	-	25.9	8.3	2.15	-	-	2.1	(-)	105	105	19	
20	59	6 Y	II	D	12	17.9	3.8	0.68	4.9	-	1.9	10 ³	102	110	-	
21	44	2 M	III	F	-	23.0	7.4	1.70	62.6	-	-	10 ³	100	-	-	
22	25	2 M	IV	D	8	20.9	1.8	0.38	35.7	-13	2.2	(-)	97	87	-	
23	47	1 Y	III	F	20	23.9	7.0	1.67	50.0	+2	2.2	10 ³	95	108	52	
24	68	3 Y	V	D	42	23.6	4.3	1.01	10.3	-12	1.4	10 ⁴	95	97	-	
25	45	4 Y	III	D	10	31.2	6.8	2.12	15.6	+12	2.6	10 ³	94	96	32	
26	38	16 Y	IV	F	-	21.7	4.8	1.04	19.8	+6	-	10 ³	92	100	-	
27	57	7 Y	V	D	-	22.6	5.8	1.31	40.0	-	2.6	10 ³	92	87	38	Lung fibrosis
28	46	-	IV	F	126	24.5	2.0	0.49	47.5	+18	2.3	10 ⁴	92	95	-	
29	56	7 Y	V	D	58	23.6	6.8	1.60	2.0	+9	1.9	10 ³	90	89	-	
30	26	1 Y	IV	-	13	24.9	5.0	1.25	45.8	-	1.8	10 ⁴	90	90	23	
31	34	1 M	III	-	7	25.6	8.3	2.12	-	-	2.1	(-)	90	109	31	
32	45	1 Y	III	F	15	34.0	17.7	6.02	81.0	+47	1.7	(-)	89	85	-	
33	60	4 M	III	D	82	27.3	5.5	1.50	25.4	-	2.0	10 ³	88	-	-	
34	43	2 M	III	D	7	30.4	9.9	3.01	24.7	-6	1.3	10 ³	88	-	33	
35	24	10 Y	III	-	2	27.3	6.1	1.67	35.9	-	2.0	(-)	87	100	-	
36	45	4 Y	IV	F	8	24.8	5.2	1.29	22.8	-	-	(-)	87	97	39	
37	58	3 Y	II	-	107	23.6	4.4	1.04	10.7	+3	2.4	10 ³	85	78	32	
38	28	15 Y	III	D	13	21.2	6.6	1.40	39.0	-	1.6	10 ³	83	102	-	D. M
39	12	-	I	F	-	24.0	3.5	0.84	49.0	-22	-	-	80	116	-	
40	36	10 Y	IV	-	24	30.0	8.5	2.59	19.5	-	1.7	10 ³	80	117	-	
41	64	1 Y	II	D	21	19.0	3.4	0.65	4.0	-7	2.4	10 ³	-	-	52	
42	42	5 Y	III	-	20	30.6	7.9	2.42	19.5	+4	1.6	(-)	-	-	38	
43	61	-	np	-	45	23.8	3.8	0.90	5.0	-3.6	1.6	(-)	-	81	38	
44	47	3 Y	IV	-	36	24.0	11.8	2.83	18.0	-	1.6	10 ³	-	-	37	
45	53	1 Y	IV	-	54	26.9	10.5	2.82	32.8	-	1.3	(-)	-	-	31	
46	41	1 Y	IV	D	13	33.0	9.0	2.97	42.3	-5	2.1	10 ³	-	-	29	
47	49	30 Y	IV	-	20	26.3	3.9	1.03	28.2	+19	1.0	10 ³	-	-	25	
48	30	3 M	II	D	6	26.4	9.8	2.59	27.6	+7	-	10 ³	-	-	23	
49	64	6 Y	V	D	54	24.0	8.2	1.97	68.8	-	3.1	10 ³	-	-	15	
50	21	2 Y	III	F	3	35.6	10.8	3.84	54.8	+32	1.3	10 ³	-	120	-	
51	53	10 Y	III	F	16	27.8	7.8	2.17	13.4	-8	1.8	10 ³	-	115	22	
52	24	7 Y	III	-	15	32.4	4.2	1.36	1.5	+28	1.2	10 ³	-	87	-	
53	58	3 M	IV	D	72	17.6	2.0	0.35	6.8	-1	1.9	10 ³	-	82	-	

る MIF test, PHA による芽球化現象で, 両者を比較検討したが, 組織像とこれら検査の間に一定の傾向はみられなかった(表7).

表7. Correlations between Thyroid Histological Findings and MIF Production in Response to Thyroid Microsomal Fraction, and Blastogenesis of Lymphocytes in Response to PHA in Patients with Chronic Thyroiditis.

	MIF(+)	MIF(-)	PHA(+)	PHA(-)
Focal	4	11	2	4
Diffuse	8	11	5	7

血沈値は正常値を示すものから高度に亢進しているものまで認められたが, MIF test, PHA による芽球化現象との間には一定の関係はみられなかった.

甲状腺機能は機能亢進の状態にある症例 No. 32 を除いて全例に甲状腺末の投与をおこなっているが, なお機能低下症の状態にある症例が53例中11例 (No. 4, 8, 12, 13, 20, 22, 28, 39, 41, 43, 53) 21% に認められた. MIF test, PHA による芽球化現象の関係は, 甲状腺 microsome 分画による, MIF test 陽性群と陰性群, PHA による芽球化率の正常群と低下群に分け, T_v値を t 検定で検討したが差異はみとめられなかった.

¹³¹I uptake, BMR は, 対象となった患者が外来患者が多く, 誤差が推測されたが, ¹³¹I uptake は 1.5% から 81% にわたり, 平均 33.3 ± 21.6 SD% であった. また BMR は -31% から +47% にわたり, 平均 2.2 ± 16.1% であった. これら検査と MIF test, PHA による芽球化現象との関係は, 甲状腺機能の場合と同様に検討したが, 有意差はみられなかった.

血清 γ -globulin 量は 1.0 g/dl より 3.1 g/dl にわたり, 平均 1.9 ± 0.4 SD g/dl であり, 正常値 0.6 ~ 1.5 g/dl より高値を示す症例が 45 例中 36 例, 80% に認められた. 血清 γ -globulin 量と MIF test, PHA による芽球化現象との間には一定の関係はみられなかった.

(4) 流血抗体産生と細胞性免疫との関連性

TRC 陽性者は 52 例中 38 例, すなわち 73% であり, さらに陽性者の内の 19 例, 50% は 10⁴ 倍以上の高値を示した. 一方甲状腺 microsome 分画による MIF test 陽性者は 40 例中 12 例 (No. 1 ~ 12), すなわち 30% であり, thyroglobulin 抗原による MIF test 陽性者は 38 例中 2 例, すなわち 5% であった. また, PHA に対する芽球化率が異常低値を示したのは 26 例

中 14 例 (No. 5, 8, 19, 25, 30, 31, 34, 37, 45, 46, 47, 48, 49, 51) すなわち 50% であった. さらに甲状腺 microsome 分画, thyroglobulin による, MIF 産生, あるいは PHA に対する芽球化率の低値のいずれかひとつが認められる症例は, これら 3 つの検査を同時に施行しえた 12 例中 8 例, すなわち 67% であった.

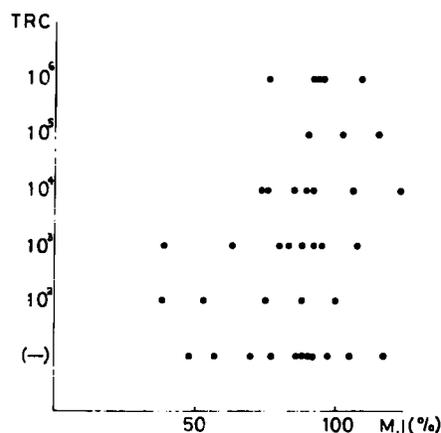


図4 Correlations between MIF Production in Response to Thyroid Microsomal Fraction and Antithyroglobulin Antibody in Patients with Chronic Thyroiditis.

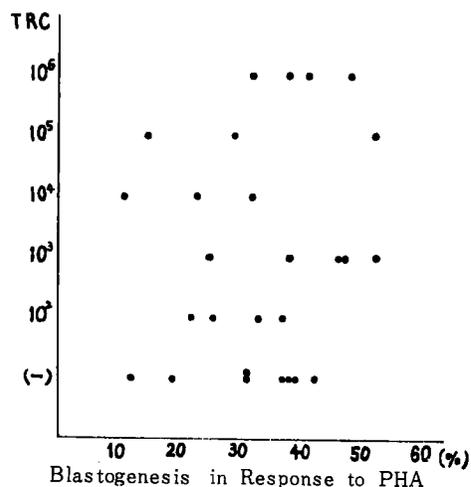


図5 Correlation of Blastogenesis in Response to PHA to Antithyroglobulin Antibody in Patients with Chronic Thyroiditis.

甲状腺 microsome 分画による MIF test の migration index と TRC の関係は、図 4 に示す如く、MIF test 陽性を示した 12 例中 9 例は TRC titer が 10^3 倍以下で、 10^4 倍以上の高値を示した症例は 3 例であり、MIF 産生増加症例では TRC titer が低い傾向が推測されたが、逆に TRC titer 低値の症例の半数以上が MIF test 陰性であり、明瞭な関係はみられなかった。

また甲状腺 microsome 分画による MIF test の migration index と PHA による幼若化率の関係は図 6 に示す如く相関関係は認められなかった。

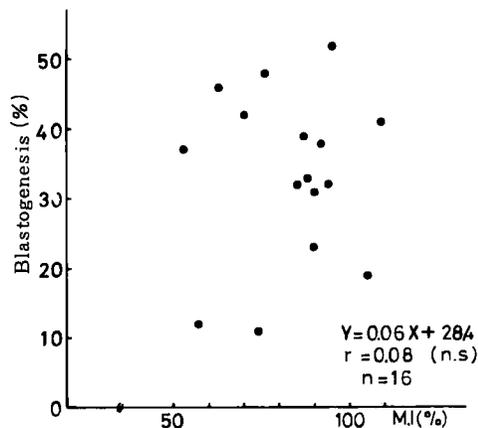


図 6 Correlation of MIF Production in Response to Thyroid Microsomal Fraction to Blastogenesis in Response to PHA in Patients with Chronic Thyroiditis.

(5) 自己免疫現象が関与していると考えられる疾患を合併した橋本病患者の細胞性免疫について

No 8, 10, 38 は糖尿病, No 12 は pseudoxanthoma elasticum と糖尿病¹²⁾, No 27 は肺線維症, No 30 は関節リウマチを合併していた。No 14 は 3 年前バセドウ病の診断のもとに約 1 年間抗甲状腺剤の治療を受けていた。糖尿病を合併した 3 症例の甲状腺 microsome 分画に対する MIF test は、57%, 48%, 83%, thyroglobulin に対する MIF test は、73%, 93%, 102%, PHA による芽球化率は No 8 では 12% であった。

Pseudoxanthoma elasticum, 糖尿病を合併した症例では、甲状腺 microsome 分画に対する、MIF test は 38% と強い遊走阻止が認められた。

肺線維症を合併した症例では甲状腺、microsome 分画、thyroglobulin に対する MIF test はそれぞれ

92%, 87% であり、PHA による芽球化率は 38% であった。

関節リウマチを合併した症例では甲状腺 microsome 分画、thyroglobulin に対する MIF test はともに 90%, PHA による芽球化率は 23% であった。

またバセドウ病より橋本病に移行したと考えられる症例では甲状腺 microsome 分画、thyroglobulin に対する MIF test はそれぞれ 117%, 110% であった。

(6) 甲状腺疾患の家系発生を認めた橋本病患者 1 例の細胞性免疫

No 13 は 4 人姉妹の 3 人に甲状腺腫があり、姉 2 人がバセドウ病と橋本病であった。甲状腺 microsome 分画、thyroglobulin に対する MIF test はそれぞれ 123%, 118% であり、組織像は、リンパ球、プラスマ細胞の浸潤が著しい橋本病の所見と、一部に腺組織の増殖を伴ったバセドウ病様の所見が認められた。

IV 考 按

橋本病は代表的自己免疫疾患のひとつと考えられており、抗 thyroglobulin 抗体 (TRC) と組織障害の程度に相関がないこと^{13) 14)}, 甲状腺組織に多数のリンパ球浸潤がみられること、他の自己免疫疾患を合併した症例があること^{15) 16) 17)}, 実験的甲状腺炎が感作リンパ球で作りうること¹⁸⁾ などより、細胞性免疫の異常が関与していることが考えられ、また橋本病とバセドウ病は合併⁴⁾ したり移行する症例があることより、病因の類似性が推測されている。

著者の検討では、橋本病で PHA による芽球化率の低下は 54%, 甲状腺 microsome 分画による MIF test 陽性例は 30%, thyroglobulin, 加熱変性 thyroglobulin による MIF test 陽性例はそれぞれ 2 例、1 例であったが、これらの検査をすべて行いえた 12 例では、いずれかが陽性を示した症例は 8 例、すなわち 67% であった。一方バセドウ病では PHA による芽球化率の低下はみられなかったが、甲状腺 microsome 分画、thyroglobulin による MIF test 陽性例が、それぞれ 1 例及び 4 例に認められた。しかし正常対照群との間に有意差はみられなかった。

これらは橋本病患者の末梢リンパ球に何らかの異常があることを示唆する所見と考えられ、橋本病患者の病態生理に関係している可能性が推測された。

そこで橋本病患者末梢リンパ球の MIF test, PHA による芽球化現象と患者の年齢、甲状腺腫発見より

の期間、甲状腺腫の大きさ、組織学的に focal thyroiditis であるが diffuse thyroiditis であるか、さらに甲状腺機能との関連について検討したが、いずれにおいても明瞭な関係はみられなかった。

また橋本病の病因として抗体産生系の異常が推定されている理由のひとつに、自己免疫疾患と考えられる他の疾患を合併あるいは併発することがあげられている。著者の対象とした53例の橋本病患者中には、糖尿病を合併した症例が3例 pseudoxanthoma elasticum と糖代謝異常がみられた症例、肺線維症、関節リウマチを合併した症例が各1例認められた。Le Compte¹⁹らは糖尿病患者の Pancreas Langerhans 島にリンパ球浸潤を認めており、岡田²⁰はマウスを insulin で感作して作製した実験的糖尿病の Pancreas に多数のリンパ球浸潤が認められることを示している。関節リウマチの関節滑膜組織、肺線維症の肺組織にもリンパ球浸潤がみられるが、これらの所見は橋本病の組織像と類似している点で興味深い。

さらに橋本病においては TRC が高率に、しかも高 titer で検出される症例が多く¹⁵、甲状腺ろ胞細胞の障害作用をもつ要因が抗 thyroglobulin 抗体や補体結合抗体などの circulating antibody であるか、cell-mediated immunity の異常であるかについては一定の見解が得られてない。著者の検討では、甲状腺 microsome 分画による MIF test 陽性症例では TRC titer が低い傾向がみられたが、TRC titer が低い症例で MIF test が陽性を示す傾向はみられなかった。PHA による芽球化率と TRC titer の間にも相関関係は認められず、両者が病因にいかに関与しているかは明らかにすることができなかった。

ところで甲状腺疾患の細胞性免疫を LMIT で検討した諸家の報告では、Sjögberg¹¹は thyroid extract により、橋本病患者の末梢白血球は遊走が抑制あるいは促進される群、中間の3群があり、抗原添加量を増量したところ、非特異的抑制が現れ、抗原の純度に問題があったことを推測している。

Roitt, Brostoff⁹らは甲状腺 microsome 分画により、autoimmune thyroiditis, Basedow 病で有意の白血球遊走阻止がみられるが、thyroglobulin では認められないことを述べている。

Delespisse²¹らは thyroglobulin により甲状腺疾患患者29例中14例に陽性所見がみられたことを報告している。

LMIT と MIF test が感作リンパ球の同じ機能を

みているものか否か疑問とされていることは緒言で述べたが、著者の行った MIF assay は、ヒトのマクロファージの代わりに、モルモット腹腔マクロファージを指標としているため感度が低いことが難点²²とされているが、Sjögberg, Roitt, Brostoff, Delespisse らの報告にみられるリンパ球の機能とは別の機能をみていることも推測された。thyroglobulin による MIF test は橋本病、Basedow 病とも正常対照群との間に差は認められなかったが、Basedow 病では132%から54%と遊走阻止率が広範囲に分布していた。この原因は不明であった。

PHA による末梢リンパ球の幼若化率については、DeGroot は甲状腺疾患患者と健康者に差がないことを報告⁹し、Ehrenfeld¹らは正常範囲内ではあるが、hyperthyroid group は正常対照群より高く、hypothyroid group は低いことを示している⁷。著者の結果では橋本病で低下がみられたが、甲状腺機能との関係は明らかでなかった。これらの結果の差異は培養液中加入する血清の種類により生ずることが指摘されており²³、DeGroot が antologous serum, Ehrenfeld が new born calf serum、著者が小牛血清(千葉)を用いた違いが想定された。ところでこれら感作リンパ球が生体内でどのように病因に関与しているかは興味あるところであるが、感作リンパ球は感作抗原と接合して MIF を産生し²⁴、ついで macrophage activating factor²⁵ や macrophage aggregating factor²⁶ の産生によって macrophage の活性が増強される一方、mitogenic factor によって nonsensitive lymphocyte は幼若化し、cell-mediated immunity が transfer される。さらに lymphotoxic factor^{27,28} は組織障害をおこし、また抗原を貪食処理した macrophage は、その保有する多量の lysosome より lysosomal enzyme を放出し、組織障害性に作用する²⁹ことが考えられている。

末梢リンパ球が甲状腺 microsome 分画に感作されていることが推定された症例は、甲状腺組織内の多数のリンパ球浸潤をあわせ考えると、上記のような組織障害過程の可能性が推測された。

橋本病で高頻度に、また高 titer で検出される、抗 thyroglobulin 抗体、抗 microsome 抗体などの、circulating antibodies は、甲状腺組織に認められた多数の形質細胞などによって産生されたものであろうが、感作リンパ球の組織障害作用が活発な時期には、これらの血清抗体が組織抗原あるいは thyroglobulin と結合して、それら抗原が感作リンパ球に

結合するのを阻害し、その組織障害作用から保護していることが推測される。このような推測から、著者が検討した臨床所見と、細胞性免疫に相関が認められなかったこと、MIF test 陽性を示す症例で抗 thyroglobulin 抗体が低値を示していた現象、組織障害の程度と circulating antibodies に相関がなかったとする報告、circulating antibodies では、実験的甲状腺炎をつくることができなかつたとする報告³⁰⁾などを理解しうる。しかしリンパ球が甲状腺組織抗原、thyroglobulin に感作される原因は不明である。この点について Allison, Demnan, Barnes³¹⁾は、自己免疫現象は、リンパ球の subpopulation をコントロールする際に、T-リンパ球の deficiency があるためにおこるのであり、B-リンパ球の hyperactivity によるものでないことを示した。Welch³²⁾らは neonatal thymectomy をした obese chickens で、spontaneous thyroiditis ができる頻度が高いことから、また Penhale³³⁾らは X線照射で胸腺を破壊した rat で spontaneous thyroiditis が発症することからこれを実証した。一方 Irvine³⁴⁾らは橋本病患者末梢血中 Tリンパ球は正常対照者に比較して少なかったが、Bリンパ球には有意差を認めなかったことを示している。

以上甲状腺疾患の細胞性免疫について考察したが、橋本病が中年以後の女性に多いこと、家系発生がみられること³⁴⁾、他の自己免疫疾患を合併した症例が認められることなど種々の問題があり、これら方面の研究は今後に期待されることである。

V 要 約

cotton column で末梢血よりリンパ球を分離し、David のモルモット腹腔マクロファージを用いた MIF test 間接法と、PHA による芽球化現象で、橋本病、バセドウ病の細胞性免疫について検討した。

1) 橋本病患者では、甲状腺 microsome 分画を抗原とした MIF test で30%の症例が陽性を示し、PHA による芽球化率の低下は54%に認められた。これらは患者末梢リンパ球に甲状腺 microsome 分画に感作されたリンパ球があると同時に、何らかの他の異常があることが推測された。一方 thyroglobulin, 加熱変性 thyroglobulin による MIF test では正常対照群との間に差が認められず、またバセドウ病ではこれらの異常を示す所見はみられなかった。

2) TRC titer と甲状腺 microsome 分画による MIF test の migration index の間には相関関係はみられなかったが、migration index が低値を示した症例は TRC titer が低値であった。

3) MIF test の migration index および PHA による芽球化率と年齢、甲状腺腫発見からの期間、甲状腺腫の大きさ、甲状腺組織、甲状腺機能などとの間には相関が認められなかった。

4) 以上の成績および橋本病甲状腺内に多数のリンパ球浸潤がみられることから、本症の病態成立に甲状腺 microsome などの甲状腺成分を抗原とした細胞性免疫の機構が何らかの関与をしていることが推定せられ、さらに MIF test 陽性の症例では血清抗体が低値であったことから、血清抗体は細胞性免疫と抗原を競合してむしろ細胞性免疫の機構に抑制的に働くことが憶測された。

稿を終えるにあたって御懇篤なる御指導御校閲を賜った恩師大藤真教授、太田善介助教授ならびに終始細部にわたる御教示を仰いだ鈴木信也講師に深甚なる感謝の意を表します。御協力いただいた甲状腺研究班の諸先生に厚く感謝致します。

本論文の要旨は第45, 46回日本内分泌学会総会で発表した。

文 献

- 1) Sjøberg, M. and Halberg, P.: Acta med. scand., 183:101, 1968.
- 2) Podlaski, W.K.: Clin. Exp. Immunol., 11:543, 1972.
- 3) Ringerz, B., Wasserman, J., Packalén, T. and Perlmann, P.: Int. Arch. Allergy., 40:917, 1971.
- 4) Means, J.H., DeGroot, L.J. and Stanburg, J.B.: The Thyroid and its Diseases. Third Edition. McGraw-Hill Book Co, Inc. New York, Toronto, and London. P-445.

- 5) Wartenberg, J., Doniach, D., Brostoff, J. and Roitt, I.M.: *Int. Arch. Allerg.*, **44**: 396, 1973.
- 6) DeGroot, L.J. and Jaksina, S.: *J. Clin. Endocr.*, **29**: 207, 1969.
- 7) Ehrenfeld, E.N., Klein, E. and Benezra, D.: *J. Clin. Endocr.*, **32**: 115, 1971.
- 8) 深瀬政市, 鳥塚莞爾他, 厚生省特定疾患「橋本病」調査研究班, 昭和48年研究業績 P-45, 1968.
- 9) 大滝正道: *日本血液学会雑誌*, **36**: 2, 1973.
- 10) Bloom, B.R.: *New Engl. J. Med.*, **284**: 1212, 1971.
- 11) Rocklin, R.E. and David, J.R.: *In vitro Method in Cell-Mediated Immunity*. Edited by Bloom, B.R. and Glade, P.R. Academic Press, New York and London. P-281, 1971.
- 12) 岡田奏二, 河西浩一, 鈴木信也, 大藤真, 荒田次郎. : *最新医学*, **28**: 4, 1973.
- 13) Rose, N.R., Kite, J.H., Jr. and Doebbler, T.K.: *Mechanisms of Cell and Tissue Damage Produced by Immune Reactions*. Edited by Grabar, P. and Miescher, P. Schwabe & Co., Basel, **161**, B., 1962.
- 14) Seragea, M., Vladutiu, A., Rotaru, N. and Negru, T.: *Acta Allerg.*, **21**: 139, 1966.
- 15) 竹久義明, 三好正規, 鈴木信也, 寺見武人, 大原敦, 江沢英光. : *リウマチ*, **12**: 4, 1972.
- 16) Leberthal, B.G., Wardolf, D.S. and Talal, N.: *J. Clin. Invest.*, **46**: 8, 1967.
- 17) Cruchaud, A.: *Clin. Exp. Immun.*, **3**: 771, 1968.
- 18) Davis, F.D. and Wachsman, B.H.: *Arthritis Rheum.*, **4**: 416, 1961.
- 19) LeCompte, P.M. and Legg, M.A.: *Diabetes.*, **21**: 762, 1972.
- 20) Soji Okada, Koichi Kawanishi and Tadashi Ofuji.: *Acuta Medica Okayama.*, **29**: 237, 1975.
- 21) DeLespresse, G., Duchateau, J., Kennes, B., Govaerts, A. and Bastenie, P.A.: *Horm. and Metab. Res. Impress.*, 1973.
- 22) Bloom, B.R.: *New Engl. J. Med.*, **284**: 1212, 1971.
- 23) 小島弘敬, 高安久雄, 亀井喜世子, 常松之典. : *アレルギー*, **21**: 8, 1972.
- 24) Bloom, B.B. and Bennett, B.: *Federation Proceedings.*, **27**: 1, 1968.
- 25) Barnet, K., Pekarek, J. and Johanovsky, J.: *Experimentia.*, **24**: 298, 1968.
- 26) Lolekha, S., Dray, S. and Gotoff, S.D.: *J. Immunol.*, **104**: 296, 1970.
- 27) Ruddle, N.H. and Waksman, B.H.: *J. Expt. Med.*, **128**: 1267, 1968.
- 28) Kalb, W. P. and Granger, G.H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **61**: 1250, 1968.
- 29) Bitensky, L.: *Brit. Med. Bull.*, **19**: 241, 1963.
- 30) Terplan, K.L., Witebsky, E., Rcse, N.R., Paine, J.R. and Egan, R.W.: *Am. J. Path.*, **36**: 213, 1960.
- 31) Allison, A.C., Denman, A.M. and Barnes, R.D.: *Lancet*, **2**: 135, 1971.
- 32) Welch, P., Rose, N.R. and Kite, J.H.: *J. Immunol.*, **110**: 575, 1973.
- 33) Penhale, W.J., Farmer, A., McKenna, R.P. and Irvine, W.J.: *Clin. exp. Immunol.*, **15**: 225, 1973.
- 34) Doniach, D., Nilsson, L.R. and Roitt, I.M.: *Acta Paediat. Scand.*, **54**: 260, 1965.
- 35) Urbaniak, S.J., Penhale, W. J. and Irvine, W.J.: *Clin. exp. Immunol.*, **15**: 345, 1973.

Cell-mediated immunity in Hashimoto's disease and Basedow's disease
Part I. Studies on migration inhibition factor (MIF) and
lymphocyte blastogenesis with phytohaemagglutinin (PHA)

Yoshiaki TAKEHISA

The Third Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School,
Okayama, Japan

(Director : Prof. Tadashi Ofuji)

Cellular hypersensitivity was studied using in vitro lymphocyte transformation technique with PHA and indirect MIF test in 53 patients with Hashimoto's thyroiditis, 29 patients with Basedow's disease and in 16 normal subjects.

Lymphocytes were separated from peripheral blood by cotton columns. In the studies of lymphocyte blastogenesis, 2 ml of lymphocyte suspension containing 1.5×10^6 cells/ml in TC-199 supplemented with 15% calf serum were cultured with 200 μg PHA for 72 hours at 37° C in an atmosphere containing 95% air and 5% CO₂, and blastoid cells were identified by microscopic examinations. For the MIF test, 2 ml of 3×10^6 lymphocytes/ml in TC-199 containing appropriate antigens (human thyroid microsome fraction; 100-500 μg wet weight/ml, thyroglobulin; 100 μg /ml) were cultured at the same circumstances for 72 hours and then the culture supernatants were examined for the migration of guinea-pig peritoneal macrophages. Migration index (M.I.) was a rate of the area of migration in supernatant with antigen to that without antigen.

The rate of blastogenesis of lymphocytes in response to PHA was $32.5 \pm 11.2\%$ (mean \pm SD) in 26 patients with Hashimoto's disease, $49.0 \pm 7.6\%$ (mean \pm SD) in 11 patients with Basedow's disease, and $49.0 \pm 8.1\%$ in 14 normal subjects. Significant low response to PHA (the rate under 33%, mean - 2SD of normal subjects) was recognized in 14 patients (54%) with Hashimoto's disease. No patient with Basedow's disease showed abnormal response to PHA.

Migration index (MI) with thyroid microsomal fraction was $85.6 \pm 19.5\%$ in 40 patients with Hashimoto's disease, $96.6 \pm 8.2\%$ in 15 patients with Basedow's disease, and $97.6 \pm 10.1\%$ in 18 normal subjects. MI under 77.4% (mean - 2SD of normal subjects) was recognized in 12 patients (30%) with Hashimoto's disease. But, MIF production against native or denatured thyroglobulin was negative in all patients examined. There was no definite correlation between MIF production in response to thyroid microsomal fraction and antithyroglobulin antibody titer in patients with Hashimoto's disease.

But the patients with positive MIF test showed low or negative thyroglobulin antibody in serum. There were no apparent correlations between MIF test, blastogenesis of lymphocytes with PHA and clinical findings such as age, duration of disease, histology and thyroid function.

Above results indicated that T-lymphocyte activity or population of T-lymphocytes responding to PHA was decreased in Hashimoto's disease.

On the other hand, it was also shown that the population of lymphocytes sensitized against thyroid autoantigens was present in the peripheral circulation of some patients with this disease. Whether they were T- or B-lymphocytes was not conclusive from the present studies. These sensitized lymphocytes might play important roles in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis.