全身性エリテマトーデスにおける B 細胞由来 B 細胞刺激因子についての検討

前 田 裕 弘・堀 内 房 成・濱 崎 浩 之
小 山 敦 子・藤 本 卓 也・入 交 清 博・堀 内 篤

Jpn. J. Clin. Immun., 10(4): 384~391, 1987.

B cell derived B cell stimulatory factors in patients with systemic lupus erythematosus

Yasuhiro Maeda, Fusanari Horiuchi, Hiroyuki Hamazaki
Atsuko Koyama, Takuya Fujimoto, Kiyohiro Irimajiri and Atsushi Horiuchi

Third Department of Internal Medicine, Kinki University School of Medicine

【Summary】

We investigated the relation between polyclonal B cell activation and B cell derived B cell stimulatory factors (BSF) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). B-BCGF activity and IL-1 activity were detected in SAC stimulated B cells supernatant. No significant difference in BCGF-like activity was observed among the active SLE group, inactive SLE group and normal subjects. BCDF-like activity, however, was higher in the active SLE group than the inactive SLE group and normal subjects. Furthermore, IL-1 activity in the active SLE group was also higher than in the other two groups. Anti-human IL-1 antibody inhibited BCGF-like and BCDF-like activity. The inhibition rate was highest in the active SLE group. These results suggested that IL-1 production by SAC stimulated B cells was much higher in active SLE than in inactive SLE, and (that) IL-1 could act as inducer of antibody production. B cell derived IL-1 may be involved in polyclonal B cell activation. As B cells of some patients in the active SLE group spontaneously produced IL-1 and B-BCGF, we speculated that B cells had already been activated *in vivo*.

Key words : SLE,
B-BCGF,
IL-1

【概 要】

全身性エリテマトーデス (SLE) の多クローン性B細胞活性化に関連するB細胞由来の B cell stimulatory factor (BSF) について検討した。B細胞を SAC で刺激培養した上清中の BCGF 様活性は活動性 SLE 群、非活動性 SLE 群および健康人群の3群間には有意の差はみられなかった。しかし、BCDF 様活性は活動性 SLE 群において亢進していた。さらに、IL-1 活性を測定したところ、活動性 SLE 群において他の2群よりも高値を示した。同上清を抗 IL-1 抗体で処理後の BCDF 様活性は活動性 SLE 群において他の2群よりも抑制率が高かった。このことより、活動性 SLE 群における同上清中の BCDF 様活性の亢進は IL-1 の抗体産生作用によるものと思われた。また、活動性 SLE 群のなかにはB細胞を無刺激で培養しても、その上清中には高力価の BCGF 様活性、BCDF 様活性および IL-1 活性を含有する症例があり、*in vivo* での著明な活性化が考えられた。

I. 緒 言

全身性エリテマトーデス (SLE) は自己免疫疾患の代表的疾患であり、多クローン性B細胞活性化とそれに伴う多彩な自己抗体の産生を免疫学的特徴としている。本研究ではその多クローン性B細胞活性化に関連する factor としてB細胞由来の B cell stimulatory factor (BSF) を検討したので報告する。

II. 対 象

1982年のアメリカリウマチ協会の分類基準を満たした SLE 患者12例（全例女性、年齢は27～45歳）で、厚生省研究班の SLE 活動性判定基準によって活動性（5例）と非活動性（7例）に分けた。活動性 SLE 群は全例副腎皮質ステロイド剤投与前の症例で、非活動性 SLE 群は維持療法としてプレドニソロン 5～10 mg の投与を受けている症例であった。なお、健康人7例を対照にした。

III. 方 法

1. B細胞の分離

ヘパリン加末梢血を Ficoll-Paque 比重遠心法によって単核細胞を分離し、plastic dish (Falcon Labware #3003) 付着法により、付着細胞を除去した。非付着細胞はE-ロゼット法を2回施行し、ロゼット形成細胞とロゼット非形成細胞に分けた。さらに、ロゼット非形成細胞に対し、OKT3 および OKM1 抗体 (Ortho Pharmaceutical Corp.) および家兎補体 (望星サイエンス) を加え、補体依存性細胞溶解反応でT細胞と単球を除去し、えられた分画をB細胞分画とした。なお、この分画中の OKT3 陽性細胞の含有率は2%以下、OKM1 陽性細胞の含有率は1%以下であった。

2. B細胞培養上清の作製

B細胞を $5 \times 10^5/\text{ml}$ に調整し、最終濃度が0.01%になるように Staphylococcus aureus Cowan I (SAC) を加え、72時間培養後、上清を回収し、これをB細胞培養上清とした。

3. BCGF 様活性および BCDF 様活性の測定

健康人B細胞を $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、最終濃度が0.01%になるように SAC を加え、72時間培養後、上記のB細胞培養上清を加え、BCGF 様活性は72時間培養後の ^3H -Thymidine の取り込みで測定し、BCDF 様活性は6日間培養後の reverse hemolytic plaque assay で IgM 産生細胞の数を算定した。

4. reverse hemolytic plaque assay

protein A (Pharmacia) で被覆したヒツジ赤血球液 $100 \mu\text{l}$ 、 $5 \times 10^5/\text{ml}$ に調整した被検細胞 $100 \mu\text{l}$ 、抗ヒト IgM ウサギ血清 Ig 分画 (Cappel Corp.) を32倍希釈したもの $20 \mu\text{l}$ および寒冷飽和したモルモット補体 (デンカ生研) $20 \mu\text{l}$ を加え、Cunningham チャンバーに $100 \mu\text{l}$ 入れ、 37°C で5～8時間静置し形成された PFC (IgM 産生細胞) 数を算定した。

5. IL-1 活性の測定

LBRM 33-IA5-10^{1,2}) (大阪大学癌研、濱岡利之教授より供与) を $2 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、上記のB細胞培養上清を加え、24時間培養後上清を回収し、 $1 \times 10^5/\text{ml}$ に調整した IL-2 dependent cell line である CT6 (大阪大学癌研、濱岡利之教授より供与) に加え、48時間培養後の ^3H -Thymidine の取り込みで測定した。

6. IL-2 活性の測定

上記 CT6 を $1 \times 10^5/\text{ml}$ に調整し、B細胞培養上清を

図1 B細胞培養上清の各濃度におけるBCGF様活性 (----コントロール)

図2 B細胞培養上清中のBCGF様活性

加え、48時間培養後の³H-Thymidineの取り込みで測定した。

7. 抗IL-1抗体

Genzyme社のpolyclonal rabbit anti-human IL-1 antibodyをagarose吸収後、8倍希釈し、B細胞培養上清100μlに対し抗IL-1抗体を10μl加えて用いた。また、この抗IL-1抗体にはcytotoxicityがないことを確認の上assayに使用した。

IV. 結 果

1. BCGF様活性およびBCDF様活性

図1に示すように活動性SLE群では個人差がみられたが、平均値で比較すると、最終濃度30%、20%、10%でも3者間には有意差は認められなかった。しかし、BCDF様活性(図2)は、最終濃度20%で活動性SLE群2,612±485(PFC/10⁶)、非活動性SLE1,480±87(PFC/10⁶)、健常人群930±125(PFC/10⁶)で活動性SLE群において亢進していた(p<0.001)。

2. IL-2活性

CT6およびPHA induced IL-2 dependent cellとも有意の³H-Thymidineの取り込みは認められず、IL-2活性はないものと思われた(図3)。

3. IL-1活性

SLE群では高活性を示す症例と低活性を示す症例が認められたが、平均値では活動性SLE群11,396±6,195 cpm、非活動性SLE群6,210±3,794 cpm、健常人群2,468±1,060 cpm(最終濃度50%で測定)で活動性SLE群において亢進していた(図4)。また、活動性SLE群で高活性を示した2症例のB細胞は無刺激で培養しても、その上清中には高力価のBCGF様活性が認められ、SACで刺激培養してもその活性はそれほど増強しなかった(図5)。

図3 B細胞培養上清中のIL-2活性(----コントロール)

4. BCGF様活性に対する抗IL-1抗体の影響

B細胞培養上清にはB-BCGFおよびIL-1が含まれており、測定されたBCGF様活性は両者の相乗効果による活性をみているため、B-BCGFとIL-1の比率を検討するため抗IL-1抗体によるBCGF様活性の抑制を図6に示した(最終濃度50%で測定)。活動性SLE群では抗IL-1抗体処理によりBCGF様活性が $5,810 \pm 1,332$ cpm $\rightarrow$ $2,595 \pm 654$ cpmに減少し、減少率55.3%であった。同様に非活動性SLE群は減少率40.5%、健常人群39.6%で、活動性SLE群において減少率が高値であった。このことは、活動性SLE群では同上清中のIL-1がB-BCGFよりも多く含まれており、非活動性SLE群および健常人群ではB-BCGFがIL-1よりも多く含まれていることを示している。

5. BCDF様活性に対する抗IL-1抗体の影響

BCDF様活性は抗IL-1抗体処理により、減少率が活動性SLE群では60.2%、非活動性SLE群46.2%、健常人群40.1%で活動性SLE群において減少率が高値を示した(最終濃度50%で測定)。この結果よりBCGF様活性と抗IL-1抗体による抑制効果と同様、活動性SLE群において同上清中のIL-1の含有が多いと思われた(図7)。また、IL-1にはBCGF様作用と同時にBCDF作用も有することが明らかになった。

図4 B細胞培養上清中のIL-1活性(----コントロール)

V. 考案

SLEは多クローン性B細胞活性化を免疫学的特徴とする自己免疫疾患の代表的存在である。その多クローン

図5 活動性 SLE 患者 2 症例の B 細胞無刺激培養上清および SAC 刺激培養上清中 BCGF 様活性

図6 B 細胞培養上清中の BCGF 様活性と抗 IL-1 抗体処理による抑制 (---- コントロール)

性 B 細胞活性化の原因として、B 細胞自体の異常、調節性 T 細胞の異常などが考えられている³⁾が、結論には至っていない。本研究では B 細胞由来の B cell stimulatory factors (BSF) と SLE の多クローン性 B 細胞活性化との関連性を検討した。すなわち、B 細胞を抗 IgM 抗体あるいは T 細胞非依存性マイトジェンで刺激することによって、B 細胞から B-BCGF および IL-1 が産生されることが明らかにされており^{4,5)}、今回の実験では、B 細胞を SAC で刺激培養した上清中の BCGF 様活性を測定したが、SLE 群と健常人群との間に差がみら

れなかった。しかし、BCDF 様活性は明らかに活動性 SLE 群で高値を示し、他の 2 群より亢進していた。さらに、同上清中の IL-1 活性を測定したところ、活動性 SLE 群で高値を示した。このことは、活動性 SLE 群では同上清中の IL-1 が B-BCGF より優位であるために BCGF 様活性が高値を示したものと推察された。しかし、健常人群では同上清中の IL-1 活性に個人差はみられなかった。一方、SLE 群では高活性を示す群と低活性を示す群に分かれたが、両群間には免疫学的パラメータおよび臨床症状に差異は認められなかった。

図7 B細胞培養上清中のBCDF様活性と抗IL-1抗体処理による抑制
(---- コントロール)

IL-1はマウスの胸腺細胞をマイトジェン存在下で分裂増殖させる作用を有しているが、最近B細胞にも作用することが明らかになった。Howardら⁶⁾は抗IgM抗体で活性化されたB細胞の増殖がBCGFとIL-1によって相乗的に促進されることを示し、BCGFがG₀期からG₁初期に作用し、IL-1がG₁後期に作用することを示唆している。また、IL-1がB細胞を抗体産生細胞に分化させる作用をもつことも報告されている^{7,8)}。

活動性SLE群で高活性を示した2症例のB細胞は無刺激で培養しても、その上清中に高力価のBCGF様活性、BCDF様活性およびIL-1活性を有しており、SACで刺激培養してもそれらの活性はそれほど増強されなかった。このことは、それらの症例のB細胞が*in vivo*においてすでにmaximumに近い状態にまで活性化されていることを示唆しており、多クローン性B細胞活性化の結果と思われた。また、それらのfactorが悪循環に働いていることも推察された。Muraguchiら⁹⁾はB-BCGFが自己のB細胞を増殖させる説(autocrine)を提唱しており、この説に従えば、活動性SLE群では活性化B細胞が多いため、autocrine pathwayが生じやすい状態にあると考えられる。また、坂根ら¹⁰⁾はSLE患者B細胞は採血直後の非刺激状態でも自発的増殖と自発的なIg産生を行っていることを示し、SLE患者B細胞の少なくとも一部の細胞は生体内で活性化され、autocrineの様式で増殖・分化しているのではないかと示唆している。

同上清中のIL-1活性が活動性SLE群において亢進していたため、同上清を抗IL-1抗体で処理し、BCGF様活性およびBCDF様活性を測定し、その抑制率をみた。その結果、BCGF様活性およびBCDF様活性とも活動性SLE群において著明な抑制を示した。このことから活動性SLE群ではB細胞のIL-1産生能が亢進していると考えられた。この現象の解析の詳細は不明であるが、SLE患者の単球のIL-1産生能の低下の代償的機序によるもの、IL-2産生能低下によるフィードバック機構によるものなどの可能性が考えられた。

Scalaら¹¹⁾はEBウィルスでtransformしたB細胞がIL-1と拮抗するContra IL-1をみだし、B細胞はIL-1とContra IL-1の双方のlymphokineを産生しており、生体の状態に応じてその産生比を変えているのではないかと考えている。また、澤田ら¹²⁾はSLEとRA双方の診断基準を満足する患者末梢血から樹立したTKS-1細胞がIL-1増強因子を産生していることをみだした。また同時に、SLEやRAの患者末梢血B細胞を無刺激で培養し、その上清中にIL-2増強因子の存在することをみつけた¹³⁾。そして、両因子が多クローン性B細胞活性化を増強していると推察している。

自己免疫疾患モデルマウスではmotheaten homozygotesマウスの脾臓B細胞培養上清中にB cell maturation factor (BMF)活性が存在し、IgM産生細胞への分化を誘導するが、分裂・増殖は誘導しないと報告されている¹⁴⁾。また、このBMF活性はこのマウスの血中に

も認められる¹⁵⁾ことより、生体内におけるB細胞の活性化に関与している可能性が示唆されている。他の自己免疫疾患モデルマウスにおける同じような factor の報告は MRL/lpr マウスから検出された L-BCDF¹⁶⁾ がある。L-BCDF は MRL/lpr マウスのリンパ節および脾臓における異常増殖T細胞が無刺激で産生する factor で、B細胞を抗体産生細胞に分化させる。BMF も L-BCDF も産生細胞の違いはあっても多クローン性B細胞活性化に密接に関与する lymphokine であると考えられる。

われわれは以前に、SLE における T 細胞由来の BSF 活性を検討し、活動性 SLE 群において BCGF 活性および BCDF 活性とともに亢進していることを報告した¹⁷⁾。この結果は Martinez-Cordero らの報告¹⁸⁾と一致するものであった。さらに、われわれは血清中の BCGF, BCDF 活性を測定し、活動性 SLE 群で亢進していることも認めた¹⁷⁾。この成績は、活動性 SLE 群で T 細胞由来および B 細胞由来の BSF 活性の亢進を反映している結果であり、多クローン性B細胞活性化の指標になるのではないかと考えられた。

以上より、活動性 SLE 群における多クローン性B細胞活性化はB細胞由来の BSF のみでも励起できる現象であり、T細胞由来の BSF が関与すれば、さらに多クローン性B細胞活性化の程度が増強されると考えられた。しかし、どちらの BSF が first signal として働いているかは不明である。心房粘液腫患者では、その腫瘍細胞から BSF-2 が産生されB細胞を polyclonal に活性化させる¹⁹⁾が、自己免疫疾患を発症させるには至らない。このことより、SLE の多クローン性B細胞活性化に

は過剰な BSF が関与していることは確かであるが、SLE の発症にはそれ以外の因子も関与していると考えられ、今後、遺伝子制御も含めて検討していく予定である。

VI. 結 語

- 1) B細胞培養上清中の BCGF 様活性は、SLE 群および健康人群の間には有意差は認められなかった。
- 2) 同上清中には IL-2 活性は認められなかった。
- 3) 同上清中の IL-1 活性は活動性 SLE 群において亢進しており、B-BCGF 活性よりも優位であった。
- 4) 同上清中の BCDF 様活性は活動性 SLE 群で亢進しており、IL-1 と B-BCGF の両者による効果と考えられた。
- 5) 活動性 SLE 群の中にはB細胞を無刺激で培養しても高力価の BCGF 様活性を呈する症例があり、*in vivo* における著明なB細胞の活性化の結果と考えられた。
- 6) 以上より、活動性 SLE 群ではB細胞からの IL-1 産生能が亢進しており、多クローン性B細胞活性化に密接に関連する因子と考えられた。

本論文の要旨は第16回日本免疫学会学術集会(東京)において発表した。また、本研究は厚生省特定疾患自己免疫疾患調査研究班(班員、堀内 篤)の研究費の援助を受けた。実験に御協力いただいた汲川知佐子さんに感謝いたします。

文 献

- 1) Gillis, S., Mizel, S.B. : T-cell lymphoma model for the analysis of interleukin 1-mediated T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78 : 1133~1137, 1981.
- 2) Conlon, P.J. : A rapid biologic assay for the detection of interleukin 1. *J. Immunology*, 131 : 1280~1282, 1983.
- 3) 鈴木 登・坂根 剛 : SLE の成因に関する最近の知見。医学のあゆみ, 126 : 549~557, 1983.
- 4) Matsushima, K., Procopio, A., Abe, H., Scala, G., Ortald, J.R., Oppenheim, J.J. : Production of interleukin 1 activity by normal human peripheral blood B lymphocyte. *J. Immunology*, 135 : 1132~1136, 1985.
- 5) Jurgensen, C.H., Ambrus, Jr. J.L., Fauci, A. S. : Production of B cell growth factors by normal human B cell. *J. Immunology*, 136 : 4592~4547, 1986.
- 6) Howard, M., Mizel, S.B., Lachman, L., Ansel, J., Johnson, B., Paul, W.E. : Role of interleukin 1 in anti-immunoglobulin-induced B cell proliferation. *J. Exp. Med.*, 157 : 1529~1543, 1983.
- 7) Strauch, M.J., Wood, D.D. : The adjuvant activity of interleukin 1 in vivo. *J. Immunology*, 130 : 2191~2194, 1983.
- 8) Pike, B.L., Nossal, G.J.V. : Interleukin 1 can act as a B cell growth and differentiation

- factor. *Proc. Natl. Sci. USA.*, 82 : 8153~8157, 1985.
- 9) Muraguchi, A., Nishimoto, H., Kawamura, N., Hori, A., Kishimoto, T. : B cell derived BCGF function as autocrine growth factor(s) in normal and transformed B lymphocyte. *J. Immunology*, 137 : 179~186, 1986.
- 10) 坂根 剛・鈴木 登 : 自己免疫疾患におけるBリンパ球異常. *免疫薬理*, 4 : 148~156, 1986.
- 11) Scala, G., Kuang, Y.D., Hall, R.E., Muchmore, A.V., Oppenheim, J.J. : Accessory cell function of human B cells. I. Production of both interleukin 1 like activity and interleukin 1 inhibitory factor by an EBV-transformed human B cell line. *J. Exp. Med.*, 159 : 1637~1652, 1984.
- 12) 澤田滋正・武井正美・桜田正仁・康 浩一 : 単球産生因子およびB細胞産生因子による調節機構. *臨床免疫*, 17 : 632~639, 1985.
- 13) 戸村好太郎・康 浩一・三田村巧・唐崎美喜・澤田滋正 : リウマチ性疾患患者末梢血B細胞が産生するIL-2依存性増殖増強因子—多クローン性B細胞活性化に関わる可能性. *日本免疫学会学術集会記録*, 16 : 383, 1986.
- 14) Sidman, C., Paige, C.J., Schreier, M.H. : B cell maturation factor (BMF) : A lymphocytes promoting the maturation of B lymphocytes. *J. Immunology*, 132 : 209~222, 1984.
- 15) Sidman, C.L., Shultz, L.D., Evans, R. : A serum-derived molecule from autoimmune viable motheaten mice potentiates the action of a B cell maturation factor. *J. Immunology*, 135 : 870~872, 1985.
- 16) Prud'homme, G.J., Park, C.L., Fieser, T.M., Kofler, R., Dixon, F.J., Theofilopoulos, A.M. : Identification of a B cell differentiation factor (s) spontaneously produced by proliferating T cells in murine lupus strains of lpr/lpr genotype. *J. Exp. Med.*, 157 : 730~742, 1983.
- 17) 前田裕弘 : 全身性エリテマトーデスにおけるB細胞機能およびB細胞刺激因子についての検討. *日臨免誌*, 投稿中.
- 18) Martinez-Cordero, E., Alcocer-Varela, J., Alarcon-Segovia, D. : Stimulating and differentiation factors for human B lymphocytes in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.*, 65 : 598~604, 1986.
- 19) 田賀哲也・松田 正・保川 清・渡部保夫・志水正敏・村島温子・平野俊夫・岸本忠三 : ヒトB細胞分化因子(BSF-2)の異所性産生. *日本免疫学会学術集会記録*, 16 : 616, 1986.
-