慢性関節リウマチ患者骨髓由来単核球の リウマトイド因子および免疫グロブリン産生

神宮政男・江崎一子・山本政弘・野中史郎
諫山哲郎*・直野敬*・延永正

Jpn. J. Clin. Immun., 15 (3) : 224~231, 1992.

**Production of immunoglobulins and IgG rheumatoid factor
and IgM rheumatoid factor by mononuclear cells derived
from bone marrow bloods of rheumatoid arthritis patients**

Masao Shingu, Ichiko Ezaki, Masahiro Yamamoto, Shirou Nonaka,
Teturo Isayama*, Takashi Naono* and Masashi Nobunaga

Department of Clinical Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

**Department of Orthopedics, Beppu National Hospital, Beppu*

【Summary】

Mononuclear cells (MNC) from bone marrow bloods of patients with rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) patients were obtained at total knee or hip replacement of the joints and determined for their capacity to produce immunoglobulins, IgG rheumatoid factor (IgGRF) and IgMRF *in vitro*. Bone marrow bloods were obtained from tibia or femur adjacent to the affected joints, and from iliac bone which was supposed to be intact control bone marrow. Immunoglobulins and RF were measured by ELISA. IgGRF and IgMRF produced by bone marrow MNC were significantly higher in RA than in OA. There were no significant differences of RF production between bone marrow adjacent to the affected joints and intact iliac bone marrow. IgGRF/IgG and IgMRF/IgM ratios were significantly greater in RA than in OA. IgMRF produced by RA bone marrow MNC correlated with serum RF levels of the corresponding patients, but not with serum CRP levels or clinical activity index.

These results suggest that bone marrow MNC of RA patients produce high levels of RF and are responsible for elevated serum RF in RA patients.

Key words : Rheumatoid arthritis,
Rheumatoid factor,
Bone marrow cells,
Mononuclear cells

【概 要】

慢性関節リウマチ患者 (RA) 10 例および変形性関節症 (OA) 患者 11 例の膝関節および股関節の人工関節手術時に、病巣近傍部および非病巣部として腸骨よりそれぞれ骨髓血を採取、単核球を得、PWM 存在下、非存在下にて 7 日間培養し、上清の免疫グロブリンおよびリウマトイド因子 (RF) を ELISA 法にて測定した。骨髓単核球による IgGRF および IgMRF 産生は OA に比べ、RA で有意に高値を示し、病巣部と非病巣部とでは差はみられなかった。骨髓単核球培養上清中の IgGRF/IgG および IgMRF/IgM 比は OA に比べ、RA において有意に高値を示した。RA 患者骨髓単核球が産生する IgMRF 量は同患者血清中 RF 濃度と有意な正相関を示したのに対し、血清 CRP 値ないしは RA の臨床的活動指数とは無関係であった。以上より、RA 患者における単核球 RF 産生はすでに骨髓レベルで亢進しており、血清中で増加している RF のソースであることが示唆された。

I. はじめに

慢性関節リウマチ (RA) では静脈血、関節液はじめ関節滑膜由来単核球またはリンパ球のリウマトイド因子 (Rheumatoid factor, RF) 産生増加があり、その機序については種々検討されており、B リンパ球の多クローン性活性化が重要な役割を演じることが示唆されている¹⁾。また、単球・マクロファージやリンパ球の免疫異常も RF 産生に重要な作用を示すとされている。RF 産生細胞である B リンパ球や産生を制御する細胞の異常は静脈血、関節液および滑膜レベルではよく検討されているがこれらの細胞免疫の異常は骨髓の幹細胞レベルではほとんど検討されていない。一方、越智らは RA 患者骨髓由来細胞には種々の免疫異常があることを報告しており²⁾、骨髓の好中球、単球・マクロファージおよびリンパ球などの異常が関節・骨破壊に関与することを示唆している。従って、RA 患者骨髓に由来する単球・マクロファージおよびリンパ球などにも異常があることが考えられ、特に、RF 産生能およびその機序につき、検討する必要がある。そこで、RA 患者骨髓血に由来する細胞の免疫学的機能として、単核球の免疫グロブリンおよび RF 産生につき検討した。

II. 材料と方法

患者背景

研究用サンプルを採取した RA 患者 (10 例) の臨床的背景を表 1 に示す。国立別府病院整形外科で人工

膝関節 (TKR) 手術時に関節に近い脛骨骨髓、または人工股関節 (THR) 手術時に関節に近い大腿骨骨髓 (それぞれ 6 例、4 例) より骨髓血を得た。RA 患者の性別、年齢、罹患年数および血沈 (ESR)、血清 CRP 値、ヘモグロビン量 (Hb)、血清 RF 値 (レーザーネフェロメーター法により測定) および手術法を表 1 に示す。女性 8 例、男性 2 例であり、平均年齢は 59 歳 (41~75) であった。変形性関節症 (OA) 患者 (11 例) の人工関節手術時にも同様にサンプルを採取した。OA 患者は女性 9 例、男性 2 例、平均年齢は 61 歳 (43~80) であり、RA、OA では性、年齢とも

表 1 Clinical parameters of RA patients studied

Case	Sex	Age ys	Duration ys	ESR 1 hr	CRP	Hb	RF	THR TKR
1.	F	65	18	68	664	9.5	203	TKR
2.	F	75	30	52	124	8.1	28	TKR
3.	F	65	28	21	391	11.3	45	TKR
4.	F	41	10	38	1,320	11.2	255	THR
5.	M	63	15	70	312	9.6	427	TKR
6.	F	46	20	66	2,820	10.3	19	TKR
7.	F	68	12	46	363	12.4	496	THR
8.	F	61	18	100	1,860	11.5	5040	THR
9.	F	59	15	46	1,430	12.5	242	THR
10.	M	69	16	98	2,700	8.3	371	TKR

ESR=erythrocyte sedimentation rate (mm/h),
Hb=hemoglobin (g/dl), RF=rheumatoid factor
(IU, normal <25 IU), THR=total hip replacement,
TKR=total knee replacement

ほぼ一致した。OA の関節手術は TKR 4 例, THR 7 例である。RA, OA とも、病巣部として脛骨または大腿骨より骨髓血を採取したが、非病巣部として、RA, OA ともに腸骨からも骨髓血を採取した。

骨髓血の採取および単核球の分離

骨髓血は越智らの法³⁾により、ヘパリン加骨髓血 10 ml を採取した。Ficoll-Hypaque (ファルマシア) を用いた比重遠心法により単核球を分離し、 $1 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に、10% 牛胎児血清 (三菱油化) および抗生物質を含む RPMI 1640 培養液 (GIBCO) に浮遊させた。

培養

培養用 24 穴プレート (ファルコン) を用い、培養液に浮遊させた単核球 1 ml にリンパ球刺激剤として PWM (シグマ、最終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 添加 (stimulated) または無添加 (unstimulated) で 7 日間、5% CO_2 incubator 内で培養した後、1,500 回転、10 分間遠心し、上清を採取・凍結保存した (-70°C)。

ELISA 法による免疫グロブリンおよび RF の測定

得られた上清の免疫グロブリン (IgG, IgM, IgA) およびクラス別 RF (IgGRF, IgMRF) を ELISA 法により測定した⁴⁾。

リンパ球サブセットの測定

培養液に浮遊させた単核球のリンパ球サブセット、すなわちヘルパー T (T4) およびサプレッサー T (T8) を単クローン性表面マーカー抗体 (それぞれ、CD4 および CD8) を用い、FACS により分析した (SRL に依頼)。

統計学的検定

得られた成績については paired t test または non-paired t test により検定した。

III. 結 果

1. 骨髓血単核球による免疫グロブリン産生

病巣部ないし是非病巣部より得た骨髓血単核球 (MNC) をそれぞれ、Joint MNC, Iliac MNC とし、上清中に産生される各免疫グロブリンを図 1 に示す。IgG を RA と OA とで比較すると、両群間には有意な差は全く認められなかった。IgM は無刺激時病巣部、非病巣部いずれも RA で有意に高かった。また、RA および OA いずれも病巣部と非病巣部との間では産生される免疫グロブリンの差はみられなかった。さらに、表には示していないが、IgA についても、測定したが、IgG と同様の成績が得られた。

図 1 IgG and IgM produced by bone marrow-derived mononuclear cells. Mononuclear cells (MNC) derived from bone marrow of rheumatoid arthritis (RA ■) and osteoarthritis (OA ●) were cultured with or without PWM for 7 days, and the supernatants were measured for IgG, IgM and IgA by ELISA. Each point and bar show mean and S.D..

2. 骨髓血単核球による RF 産生

病巣部ないし是非病巣部より得た骨髓血単核球の RF (IgGRF, IgMRF) 産生量を図 2 に示す。IgGRF 量は PWM 刺激にかかわらず、病巣部では RA と OA との間では有意な差はなかったが、非病巣部では OA に比べ、RA で有意に高値であった。一方、IgMRF は刺激にかかわらず、また、病巣部、非病巣部にかかわらず、OA に比べ、RA で有意に高値であり、特に無刺激時では OA に比べ RA で平均 66 倍 (病巣部) ないしは 38 倍 (非病巣部) 高かったが、PWM 刺激時ではそれぞれ、3.6 倍および 9.6 倍となり、その差は縮小した。IgGRF, IgMRF いずれも末梢血に比べ、骨髓でそれぞれ数倍、数 10 倍高いが有

図2 IgGRF and IgMRF produced by bone marrow-derived MNC. MNC derived from bone marrow of RA and OA patients were cultured, and the supernatants were measured for IgGRF and IgMRF. Each point and bar show mean and S.D..

意ではなかった。IgGRF, IgMRF 量には刺激の有無にかかわらず, また RA および OA いずれにおいても病巣部と非病巣部との間では有意な差はみられなかった。

3. RA 患者由来骨髓単核球上清の RF/免疫グロブリン比

RA 患者骨髓由来単核球が産生する RF と免疫グロブリンとの比 (IgGRF/IgG, IgMRF/IgM) (%) を各症例別に計算し, その平均値を求め, これを RA と OA との間で比較すると, PWM 刺激, 無刺激に

かかわらず, また, 病巣部, 非病巣部に関係なく, IgGRF/IgG, IgMRF/IgM いずれも OA に比べ, RA で有意に高値であった。特に, 無刺激の場合, Total IgM に対する, IgMRF の比率が RA の病巣部, 非病巣部でそれぞれ, 8.81%, 11.26% と高く, 一方, Total IgG に対する IgGRF の比率はそれぞれ, 0.106%, 0.154% とそれほど著明ではなかった (図 3)。

4. RA 患者骨髓血単核球のリンパ球サブセットと RF 産生量との関係

RA 骨髓血単核球のリンパ球サブセット (T 4, T 8) および T 4/T 8 比を求め、これら、T 4, T 8 および T 4/T 8 比と、骨髓血単核球による IgGRF および IgMRF 産生量との間の相関関係を検討した。非病巣部または病巣部における、刺激または無刺激時の IgGRF, IgMRF 産生量は病巣部単核球の CD 4 とは無関係であったが、非病巣部単核球の CD 4 とは有意ではなかったものの、相関傾向を示した。一方、いずれの条件においても RF 産生量と CD 8 との間には何ら有意な関係はみられなかった。同一患者において病巣部 CD 4 と非病巣部 CD 4 とは相関しなかったのに対し、CD 8 は両部位間で有意な相関を示した (表 2)。なお、いずれの条件においても、CD 4/CD 8 比と RF 産生との間には有意な関係はなかった (成績は省略)。

5. RA 骨髓血単核球による RF 産生量と臨床的パラメーターとの関係

RA 骨髓血単核球による RF 産生量と同一患者における炎症のパラメーターである血沈・CRP 値および血清中 RF 量との関係につき検討した。RF 産生量と血沈・CRP との間には有意な関連性はみられなかったが、血清中 RF 量と骨髓血単核球が産生する IgGRF および IgMRF との間には、特に、非病巣部において有意な関係が認められたが、病巣部では何ら有意な関係はみられなかった (表 3)。

IV. 考 察

以上より、RA 患者骨髓由来単核球の IgGRF および IgMRF 産生は増強しており、特に IgMRF 産生が高くみられた。IgGRF, IgMRF とともに PWM 刺激による産生増強は RA ではみられなかったが OA では特に IgMRF の産生増強がみられた。IgGRF, IgMRF とともに病巣部と非病巣部との間には有意な差はなかった。これに対し、免疫グロブリン産生については病巣部、非病巣部ともに無刺激時、IgM が OA に比べ RA で有意に高かったが、IgG については部位または刺激の有無を問わず、RA と OA との間には何ら差はなかった。従って、RF/免疫グロブリン比は OA に比べ、RA で有意に高かった。RA における骨髓由来単核球の RF 産生量と炎症のパラメーターとの間には有意な関係はみられなかったが、非病巣部に

図 3 IgGRF/IgG and IgMRF/IgM ratios of the MNC supernatants. RF/Immunoglobulin ratios were calculated (%). Each point and bar show mean and S.D..

において、IgGRF および IgMRF 産生量と同一患者血清中の RF 量との間に有意な相関がみられた。骨髓血単核球のリンパ球サブセット (T 4, T 8, および T 4/T 8 比) と RF 産生との関係をみると、RF 産生量と CD 8 との間には何ら関係はみられなかったが、CD 4 との間に相関傾向がみられた。

以上得られた成績は症例が少なく、preliminary ではあるが RA 患者血清中で増加している RF すなわち IgMRF のソースとしてはこれまで報告されてきたように静脈血、関節液および滑膜に由来するリンパ球・単核球も考えられるが、同様に骨髓由来のリンパ球・単核球も重要な役割をはたしていることが示唆され

表 2 T lymphocyte subsets and rheumatoid factor production by bone marrow-derived mononuclear cells in rheumatoid arthritis patients

Rheumatoid factor production	Joint MNC		Iliac MNC	
	CD4	CD8	CD4	CD8
Joint MNC				
IgGRF PWM(-)	0.207(10)	0.140(10)	0.737(6)	0.140(6)
IgGRF PWM(+)	0.412(10)	-0.016(10)	0.621(6)	-0.027(6)
IgMRF PWM(-)	0.241(10)	0.186(10)	0.774(6)	0.120(6)
IgMRF PWM(+)	0.241(10)	-0.040(10)	0.765(6)	0.039(6)
Iliac MNC				
IgGRF PWM(-)	-0.309(10)	-0.176(10)	0.658(6)	-0.349(6)
IgGRF PWM(+)	-0.381(10)	-0.149(10)	0.711(6)	-0.100(6)
IgMRF PWM(-)	-0.199(10)	-0.252(10)	0.536(6)	-0.377(6)
IgMRF PWM(+)	-0.300(10)	-0.162(10)	0.677(6)	-0.058(6)
Joint MNC CD4	—	—	-0.292(6)	—
Joint MNC CD8	—	—	—	0.885(6)*

Data are expressed as correlation coefficient r values. The numbers in the parenthesis show the number of cases studied. *p<0.02, by Student t test.

表 3 Laboratory data and RF produced by MNC derived from bone marrow bloods of RA patients

Lab. data	IgGRF unstimulated		IgMRF unstimulated		IgGRF stimulated		IgMRF stimulated	
	Joint	Iliac	Joint	Iliac	Joint	Iliac	Joint	Iliac
CRP	-0.176	-0.151	-0.053	-0.041	-0.028	-0.01	0.027	0.052
ESR	0.358	0.421	0.319	0.574	-0.172	0.327	0.213	0.214
RF	0.103	0.694**	0.274	0.725**	0.415	0.662*	0.288	0.517

Correlation coefficient r values, Statistical significance by Student's t test; *p<0.05, **p<0.02

た。単核球の RF 産生量は末梢血単核球に比べ、骨髓由来単核球において数倍 (IgGRF) ないしは数 10 倍 (IgMRF) 高く、特に RA 患者血中 RF の大部分を占める IgMRF においてこのような成績が得られたこと、および骨髓由来単核球による RF 産生量と血中 RF 量との間には明らかな相関がみられたことなどは末梢血よりも骨髓により重要な異常があることを示唆する。ただ、関節液または滑膜におけるリンパ球・単核球との比較については今後の検討を要する。RF 産生は病巣部と非病巣部とでは有意な差はなかったことから、病巣部のみでなく、骨髓に普遍的な現象であることが示唆される。

成人の骨髓血中の B 細胞系統には、Pre-Bcell, B リンパ球、およびプラズマ細胞など、種々ステージの成熟段階にある細胞がみられ、骨髓は B 細胞系統が分化する重要な場であるとされる。また、特に、血清中

の免疫グロブリンの 3 分の 2 に相当する量は骨髓で産生されるといわれる⁵⁾。事実、骨髓 B 細胞は無刺激で多量の免疫グロブリンを産生し⁶⁾、それは骨髓中の T リンパ球により支配されているという⁷⁾。これらの B 細胞は heterogenous であり、その機能や構造の面から、末梢のそれとは大きく異なっていることが示された。一方、骨髓中 B リンパ球の免疫グロブリン産生は骨髓中のマクロファージ・単球および T 4 (helper T) および T 8 (suppressor T) リンパ球により制御される⁸⁾。

静脈血単核球の IgMRF 産生は免疫グロブリン産生量の 6% にあたるとされる⁹⁾が、今回の成績ではこの比率 (IgMRF/IgM) は RA では 11.26% (非病巣部)、8.81% (病巣部) であり、OA ではそれぞれ、0.63%、0.26% と、RA に比べると低く、RA 患者骨髓細胞の RF 産生は RA にかなり特異的であるといっ

てもよからう。関節液由来の単核球が、静脈血や骨髓血に比べ、最も高い IgMRF 産生を示すとする報告もある⁹⁾。静脈血や関節液中の RF 産生増加の機序として、T 4 増加、T 8 減少のような、T 細胞異常¹⁰⁾ないしは液性因子¹¹⁾を指摘する報告がある。今回、骨髓細胞の T 4、T 8 と RF 産生との関係を見ると、RF 産生と CD 8 陽性率とは無関係であったが、CD 4 とは相関傾向を示したことから、CD 8 陽性細胞（サブレッサー T 細胞）よりもむしろ、CD 4 陽性細胞（ヘルパー T 細胞）が RF 産生亢進に関与していることが示唆された。このことは CD 8 陽性細胞が病巣部と非病巣部とは相関しているのに対し、CD 4 陽性細胞は両部位では全く別の動きを示していることと関連がありそうである。質的異常（ヘルパー T 機能増加、サブレッサー T 機能低下など）の存在も考えられる。さらに前述のように、マクロファージ・単球系も骨髓血リンパ球の RF 産生に関与していることが考えられる。RA 患者骨髓における RF 産生亢進の機序については今後の課題である。

我々は macroglobulinemia に RA を合併した患者の骨髓より、モノクローナルな IgMRF を産生するクローンを得、マウスミエローマ細胞とのハイブリド

マを作成、RF 産生遺伝子を得た¹²⁾が、RA 患者のような多クローン性 RF 産生細胞の RF 産生遺伝子はモノクローナル RF 産生遺伝子とは構造や機能の面で異なることが考えられる。従って、多クローン性 RF 産生遺伝子を得ることが現実では重要な課題である。マウスミエローマ細胞と静脈血由来リンパ球とのハイブリドマ作成は非常に困難であったが、骨髓由来リンパ球とは可能であったことから¹²⁾、今回の成績は RA 患者における RF 産生に関する遺伝学的検討を行う点においても示唆にとむ成績であり、事実、RA 患者骨髓由来 B リンパ球とマウスミエローマ細胞とのハイブリドマ作成によりいくつかの RF 産生クローンを得ることができたので、現在、T 細胞や単球の検討とともに遺伝学的検討もあわせ進行中である。

謝辞 本研究は厚生省リウマチ調査研究事業（総合班長 宮本昭正先生、病態研究班班長越智隆弘先生）の援助により行った。関係諸先生方の御指導に深謝致します。終始、研究の実施に携わった、研究室 河野江利子・伊藤真由美および弥野美佐子各氏に感謝致します。本論文の要旨は第 19 回日本臨床免疫学会（平成 3 年 6 月、長崎）にて報告した。

文 献

- 1) Koopman, W.J., Schrotenloher, R.E. : Enhanced *in vitro* synthesis of rheumatoid factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 23 : 985~992, 1980.
- 2) Ochi, T., Hakomori, S., Adachi, M., et al. : The presence of a myeloid cell population showing strong reactivity with monoclonal antibody directed to difcosyl type 2 chain in epiphyseal bone marrow adjacent to joints affected with rheumatoid arthritis (RA) and its absence in the corresponding normal and non-RA bone marrow. *J. Rheumatol.*, 15 : 1609~1615, 1988.
- 3) 越智隆弘 : 慢性関節リウマチの病型と骨髓の変化. *日整会誌*, 61 : 599~605, 1987.
- 4) 和田哲也・神宮政男・吉岡和則・他 : 健康者単核球の免疫グロブリンおよびリウマトイド因子産生に対する寛解導入剤の影響. *炎症*. 印刷中.
- 5) Abramson, S., Miller, R.G., Phillips, R.A. : The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid system. *J. Exp. Med.*, 145 : 1567~1579, 1977.
- 6) Mills, G.B., Ledgley, C.J., Hibi, J. et al. : Lymphocyte function in human marrow. 1. Characterization of two T cell populations regulating immunoglobulin secretion. *J. Immunol.*, 134 : 3036~3041, 1985.
- 7) Dosch, H.M., Ledgley, C.J., White, D. et al. : Lymphocyte function in human bone marrow. II. Characterization of an interleukin 2 sensitive T precursor cell population. *J. Clin. Immunol.*, 5 : 345~356, 1985.
- 8) Ringden, O. : Induction of immunoglobulin secretion by protein A from staphylococcus aureus in human blood and bone marrow B cells. *Scand. J. Immunol.*, 22 : 17~26, 1985.

- 9) Panush, R.S., Bittner, A.K., Sullivan, M. et al. : IgM rheumatoid factor elaboration by blood, bone marrow and synovial mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. Clin. Immunol. Immuno-pathol., 34 : 387~391, 1985.
 - 10) Goto, M., Miyamoto, T., Nishioka, K. et al. : T cytotoxic and helper cells are markedly increased, and T suppressor and inducer cells are markedly decreased, in rheumatoid synovial fluids. Arthritis Rheum., 30 : 737~743, 1987.
 - 11) Kitani, A., Hara, M., Hirose, T. et al. : Synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis possessed B cell differentiation activity contributing to synthesis of rheumatoid factor *in vitro*. J. Rheumatol., 14 : 873~879, 1987.
 - 12) Ezaki, I., Kanda, H., Sakai, K. et al. : Restricted diversity of the variable region nucleotide sequences of the heavy and light chains of a human rheumatoid factor. Arthritis Rheum., 34 : 343~350, 1991.
-