慢性関節リウマチ患者の末梢血と関節液単核 細胞のリウマチ因子産生に関する研究

小 川 博 遊・桜 美 武 彦・井 村 裕 夫

**Studies on the rheumatoid factor synthesis of the peripheral blood and
synovial fluid mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis**

Hiroyuki Ogawa, Takehiko Sakurami and Hiroo Imura

The Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyoto University

【Summary】

Peripheral blood and synovial fluid mononuclear cells (MNC) were cultured with pokeweed mitogen for 7 days, and the media which contained secreted IgM rheumatoid factor (IgM RF) were assayed by double antibody radio-immunoassay technique, which was specific and sensitive enough to assay them.

Peripheral blood and synovial fluid MNC from seropositive RA patients synthesized high levels of IgM RF, whereas those from seronegative RA patients, patients of osteoarthritis and normal subjects synthesized low levels of it. The IgM RF titers in media were correlated well with the level present in the sera of the donors which were assayed by haemagglutination methods. Synthesis of IgM RF by synovial fluid MNC but not by peripheral blood MNC led to a concomitant synthesis of total IgM. Moreover B lymphocytes demanded helper activity of T lymphocytes for the synthesis of IgM. These data suggested that peripheral blood and synovial fluid MNC from patients with RA play an important role in the synthesis of IgM RF in vivo.

key words : immunoglobulin synthesis
rheumatoid arthritis
rheumatoid factor
synovial cell

【概 要】

末梢血単核細胞および関節液単核細胞を pokeweed mitogen 添加のもとに試験管内で7日間培養し、産生される IgM リウマチ因子 (IgM・RF) を二抗体法 radioimmunoassay (RIA) で定量し、RIA 法ならびに in vitro での IgM・RF 産生につき検討を行った。

RIA 法は、RF 強陽性の RA 患者血清の 10^6 倍稀釈までの測定が可能であった。また、RIA による血清の測定値は赤血球凝集反応の測定値と高い相関を示した。

末梢血と関節液単核細胞の産生する IgM・RF 量は血清 RF 値とよく相関し、この結果より、いずれの細胞も血清の

RF 産生に関与しているものと考えられた。しかし両者を比較した場合、関節液単核細胞はより多くの IgM-RF を産生した。IgM-RF 産生と IgM 産生を同時に測定したところ、関節液単核細胞は有意な相関を示したが、末梢血単核細胞では相関は認められなかった。また、IgM-RF 産生には B 細胞と T 細胞の協同作用が必要であった。

I. 緒言

リウマチ因子 (rheumatoid factor, RF) は IgG に対する自己抗体で、免疫グロブリン (immunoglobulin, Ig) は IgG・IgA・IgM などの各クラスに存在するが、IgM がその主体をなしている。RF は慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) 患者の約 80% に出現し¹⁾、RA の診断の上で、あるいは臨床経過をみる上でも有用な自己抗体である²⁾。ところが、RA の病因的意義に関しては、RF の産生は B 細胞の polyclonal な活性化の結果にすぎないとする考えより、その直接的な役割に対し否定的な考え方が現在のところ支配的である^{2,3)}。しかし、RF の産生機序や生物学的役割については不明な点が多く、その解明は RF の病因・病態を理解する上で重要と考えられる。

今回、私たちは末梢血や関節液中の単核細胞を pokeweed mitogen (PWM) 添加のもとに in vitro で培養し、産生される RF を radioimmunoassay (RIA) による高感度の IgM-RF 定量法により測定し、RA 患者の RF 産生機序について若干の検討を加えた。

II. 方法

(1) 対象 アメリカリウマチ協会の診断基準により、definite あるいは classical に相当する RA 患者の末梢血と関節液を用いた。末梢血の対照として、健康成人および一部の実験では SLE や PSS を含む自己免疫疾患患者のものを、関節液の対照としては変形性関節症 (osteoarthritis, OA) 患者のものをを用いた。

(2) 細胞の分離と培養 末梢血単核細胞は、Ficoll-Conray 重層遠心法⁴⁾により分離した。関節液単核細胞は、滅菌して三重に重ねたガーゼで関節穿刺により得た関節液を濾過し沈澱物を除いたのち、末梢血単核細胞と同様に重層遠心法で分離した。単核細胞中のリンパ球の純度は、ペルオキシダーゼ染色により確かめたところ、末梢血単核細胞で平均 95%、関節液単核細胞で平均 90% であった。トリパンブルー染色による生存率はいずれも 97% 以上であった。T 細胞と B 細胞 (単球も含むため正確には non T 細胞であるが、便宜上ここでは B 細胞と呼ぶ) の分離は単核細胞をノイラミダーゼ処理ヒツジ赤血球⁵⁾でロゼット形成を行ったのち、これを Ficoll-Conray 重層遠心法でロゼット形成細胞と非形成

細胞に分離し、前者を T 細胞、後者を B 細胞とした。再度、ヒツジ赤血球のロゼット形成能で確かめたその純度は、T 細胞は 97% 以上、B 細胞は 95% 以上であった。なお、ヒツジ赤血球は 0.74% 塩化アンモニウム液で溶血除去した。

細胞の培養は、20% ウシ胎児血清と 10 μ g の PWM (Gibco) を含む 1 ml の MEM 培養液 (日水) の入った培養試験管 (130 $\times$ 10 mm, Wheaton Scientific) に、先に分離した単核細胞を 1×10^6 個入れ、37°C 5% CO₂ インキュベーターの中で培養した。B 細胞単独培養のときはその 2×10^5 個を、T 細胞単独培養では 8×10^5 個を培養し、また、両者の混合培養では B 細胞を 2×10^5 個と T 細胞を 8×10^5 個、計 1×10^6 個に混合し培養を行った。培養 7 日目に遠心分離 (2,000 rpm 10 分) を行い、培養上清を採取し、IgM-RF あるいは IgM を測定するまで -20°C に凍結保存した。

(3) IgM-RF の RIA IgM-RF の RIA に用いる熱変性 IgG (aggregated IgG, agg-IgG) は次の方法で作製した。正常ヒト血清より塩析法および DEAE セルローズ・カラムクロマトグラフィーによりまず精製 IgG を得た⁶⁾。次いで、0.01 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) に IgG を 2% の濃度になるように調整し、63°C で 20 分間インキュベートしたのち 4°C 中に静置した。2 日後、4°C で 2,000 rpm 5 分間遠心し上清を集め、これをさらに 40,000 rpm で 90 分超遠心を行ったのち、ホウ酸緩衝液で沈澱物を溶かし agg-IgG を得た⁷⁾。この agg-IgG 1 μ g をクロラミン T 法⁸⁾により 500 μ Ci の ¹³¹I (New England Nuclear) で標識し、フリーの ¹³¹I は PBS による透析で除去した。

RF の測定に用いる標準液としては、特定の RF 強陽性の患者血清より $10^1 \sim 10^7$ 倍の 10 倍系列の稀釈液をつくり、これを標準液として用い、RF の力価を標準液に相当する稀釈倍数の逆数で表現した。

IgM-RF の測定方法の概略を図 1 に示した。1% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む pH 7.5, 0.01 M リン酸緩衝液 0.5 ml 中に ¹³¹I 標識 agg-IgG 0.1 ml (約 1 ng の agg-IgG を含む) と、あらかじめ Sepharose 4B (Pharmacia) に結合した agg-IgG⁹⁾ で吸収した正常ヒト血清 100 倍稀釈液 0.1 ml、さらに第一抗体として標準液あるいは試料 0.1 ml を加え 37°C でインキュベートを行った。12 時間後に第二抗体として 25 倍稀釈家兎抗

図 1 Method of measuring IgM rheumatoid factor using double antibody radio-immunoassay

図 2 Standard curve for measuring IgM rheumatoid factor

ヒト IgM 抗血清 (Behringwerke) 0.1 ml を加え、さらに 37°C で 6 時間インキュベートを行った。これを 3,000 rpm 30 分間遠心分離し、上清と沈渣に分け、そ

図 3 Comparison of inhibition curve of aggregated IgG and native IgG

れぞれの放射活性より標識抗原の結合率を求め標準曲線を作成した。試料についても各濃度で同様に結合率を算定し、その標準曲線(図2)より RF の力価を求めた。

(4) IgM の産生と血清 RF 値の測定 培養液中に産生された IgM は二抗体法 RIA¹⁰⁾ により測定した。血清の RF の測定は感作ヒツジ赤血球凝集反応 (RAHA テスト, 富士臓器) によった。

III. 結果

IgM·RF の RIA に関し、agg·IgG に対する特異性および赤血球凝集反応との関係についてまず検討した。RF は未変性 IgG とも反応するため、本測定法での未変性 IgG のおよぼす影響を agg·IgG と比較し図3に示した。その結果、RIA 法は未変性 IgG の影響を受けるものの、RF への結合率で両者には約 100 倍の濃度の開きがあり、標準液や試料中に含まれる未変性 IgG の若干の差は、一定量の正常血清を加えることにより、IgM·RF 測定への影響はある程度防ぎうるものと考えられた。

図4は、RA 患者その他の自己免疫疾患患者および正常人血清の RF について、RIA と RAHA テストとの相関を示したものである。RIA では血清を 100 倍に稀釈し測定した。両者の測定結果はよく相関し ($r=0.83$, $P<0.0005$), かつ、RAHA テストではほとんど陰性となっている正常人血清も RIA では $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$ 倍の範囲の値を示した。

関節液単核細胞と末梢血単核細胞の培養により産生された IgM·RF を RIA で測定し、その結果を図5に示し

図 4 Relationship between radioimmunoassay values and sensitized sheep red blood cell agglutination test (RAHA test) titers determined at same sera

た。OA 患者関節液単核細胞の平均値は標準血清の稀釈倍率で 408,500 倍に相当したのに対し、RA 患者の関節液単核細胞のみ平均値は 958 倍であった。一方、末梢血単核細胞では正常人平均値 57,737 倍に対し、RA 患者では 31,568 倍と正常人に比較し約 2 倍の RF 抗体価を示すにすぎなかった。しかし、RA 患者 16 名中 5 名の RF 陰性の RA 患者 (seronegative RA) を除くと、すべての症例は 10,000 倍以下の範囲に入り、しかもその平均値は 2,913 倍と正常対照の約 10 倍の抗体価を示し、この値は RA 患者関節液単核細胞の産生量に近いものとなった。なお、seronegative RA 患者のみの平均値は 95,000 倍で、正常人平均値より低値を示した。

図 5 の症例において、同時に血清の RF を赤血球凝集反応で測定し、in vitro で産生された RF との関連をみたのが図 6 である。その結果、関節液単核細胞と末梢血単核細胞の産生 RF 値は血清 RF 値と高い相関を示した ($r=0.81$, $P<0.0005$)。

図 7 は、培養により産生された IgM-RF と同時に IgM を測定し、両者の関係をみたものである。全例でみた場合、両者は有意な相関を示したが ($r=0.62$, $P<0.005$)、関節液単核細胞と末梢血単核細胞に分けてみた場合は、前者は正の相関を示した ($r=0.71$, $P<0.01$) のに対し後者は相関を示さなかった ($r=0.03$, $P>0.5$)。

図 5 Radioimmunoassay of IgM rheumatoid factor produced by peripheral blood and synovial fluid mononuclear cells
■ : seronegative RA

図 6 Relationship between IgM rheumatoid factors produced in vitro and serum RF titers of the donors

次に、IgM-RF 産生への T 細胞や B 細胞の役割について検討した結果を表 1 に示した。RA 患者と正常人それぞれの B 細胞単独培養 (B cell) あるいは T 細胞単独培養 (T cell) ではほとんど RF は産生されなかったのに対し、自己の T 細胞と B 細胞の混合培養 (B+T) では RF の産生がみられた。RA 患者の B 細胞に正常人の T 細胞を加えた場合 (RA-B+nor. T) にも IgM-RF の増加がみられたが、RA 患者の自己の T 細胞を加えた場合の約 1/2~1/10 に産生は低下した。逆に、正常人の B 細胞に RA 患者の T 細胞を加えた場合 (nor. B+RA-

図 7 Relationship between IgM rheumatoid factor production and IgM synthesis in vitro

T) は自己の T 細胞を加えた場合よりも RF の産生は増した。

IV. 考 按

RF の測定法として数多くの方法が試みられており、それぞれに特徴を持っている。特に高感度な RF の測定法としては次のような方法が報告されている。① FITC 標識抗ヒト IgM 抗血清を用い、fluorimeter で測定する方法¹¹⁾、② RF で感作赤血球の溶血を起こし、その程度を分光光度計で測定する方法¹²⁾、③ RIA による方法^{13,14,15)} などである。文献によると、① および ② 法は RF 陽性血清で 10^4 倍稀釈がその測定限度であるのに対し、RIA はさらに高感度で、その固相法^{13,14)}あるいは二抗体法¹⁵⁾により培養リンパ球の産生する RF の測定が可能となっている。今回、私たちも RIA 二抗体法により IgM·RF の測定を試みた。この RIA 法は試料中の 10 ng 以上の IgG の影響を受けるなど、測定法としてなお問題点も残されているが、RIA での血清や関節液の RF の測定結果は感作赤血球凝集反応による測定値と有意に相関する成績を得た。したがって、本法は IgM·RF の測定法としてほぼ信頼できるものと考えられた。さらに、凝集反応による RA 患者血清の測定限度がほぼ 10^3 倍稀釈であるのに対し、RIA では 10^6 倍稀釈までの測定が可能であった。以上の成績を踏まえた上で、in vitro での関節液や

表 1 Production of IgM rheumatoid factor by lymphocyte subpopulation in patients with rheumatoid arthritis and in normal subjects

		IgM·RF	
		Peripheral lymph.	Synovial lymph.
RA 1.	B lymph.	123,000	1,700
RA 1.	T lymph.	123,000	1,950
RA 1.	B+T	2,400	270
RA 1.	B+Nor. T	6,300	500*
RA 2.	B lymph.	143,000	1,400
RA 2.	T lymph.	100,000	1,300
RA 2.	B+T	4,100	190
RA 2.	B+Nor. T	44,000	1,100*
Normal	B lymph.	60,000	1,000,000*
Normal	T lymph.	44,000	270,000*
Normal	B+T	16,000	11,000*
Nor. B + RA 1.	T	2,150	460*
Nor. B + RA 2.	T	3,500	420*

: Peripheral blood lymphocytes and synovial fluid lymphocytes were isolated from different subjects.

* : Lymphocyte subpopulations of normal subject were separated from peripheral blood.

末梢血単核細胞の産生する RF を測定し、本方法で微量の IgM·RF の検出が可能であることを確認した。

RA 患者の関節組織浸潤細胞が RF を産生することはすでに蛍光抗体法¹⁶⁾や RF 溶血プラーク形成法^{17,18)}などにより証明されており、また、これらの炎症局所の細胞は末梢血中の単核細胞に比較し多くの RF を産生することも報告されている¹⁷⁾。今回の培養実験でも、RA 患者の関節液単核細胞の産生する RF は末梢血単核細胞よりも高い RF 活性を示した。ただ今回の実験では、関節液単核細胞を得られるような症例では RA の活動性が高かったこともそのひとつの要因と考えられた。Tsoukas らは、RA 患者末梢血リンパ球を培養し、その IgM·RF の産生量が RA 患者の血清の RF 値と相関したことを報告している¹⁹⁾。今回の実験でも、末梢血単核細胞とともに関節液単核細胞もその産生する IgM·RF は血清の RF 値と正の相関を示したことより、in vivo においても両方の細胞ともに RF の産生に関与しているものと考えられた。また、これらの成績は、正常人や seronegative RA 患者の in vitro での IgM·RF 産生量は RF 陽性の患者に比較し RF 産生が低下しているとする今までの報告と一致するものであった^{18,20)}。最近 Pasquali ら²¹⁾は、

seronegative RA 患者の末梢血リンパ球の IgM・RF 産生量は正常対照より低下しているとの興味ある成績を報告しているが、私たちも、少数例ではあるが、seronegative RA 患者で同様の傾向を示す結果を得た。なお、OA 患者関節液単核細胞はほとんど IgM・RF を産生しなかったが、この点は OA と RA の病因の相異に関連するものと考えられた。

私たちは前段階の実験において、関節液単核細胞は末梢血単核細胞に比較し高い IgM 産生を示し、かつ、IgM 産生量は血清中の RF 値と正の相関を示す成績を得ており、したがって、関節液単核細胞は多量の RF を産生しているものと推測していたが（現在投稿中）、今回 IgM・RF と IgM の産生を同時に測定し比較したところ、その結果は、この推測をうらづけるものであった。両者の産生の関連あることは、マウスに LPS を投与する *in vivo* の実験や²³⁾、あるいはヒト末梢血リンパ球への PWM や Epstein-Barr virus 刺激による *in vitro* の実験^{19, 20, 23)}においても IgM 産生と IgM・RF 産生が平行的な増減傾向を示すことより証明されている。しかし、私

たちの実験では末梢血単核細胞に関しては有意な相関をみなかった。

B 細胞が抗体産生細胞として機能するには、多くの抗原では T 細胞の働きを必要としている。今回、IgM・RF 産生への T 細胞の関与について単核細胞を subset に分け実験を行ったところ、関節液 B 細胞も末梢血 B 細胞もその産生には T 細胞の存在が必要であった。また、正常人の subset と組み合わせた結果より、IgM・RF の産生量は B 細胞と T 細胞の両機能の影響していることが知られた。このように、RF の産生には T・B 両細胞の協同作用が必須であることを、Tsoukas ら¹⁹⁾や Koopman ら²⁰⁾も RA 患者の末梢血リンパ球を用いた実験で報告している。ただし、今までのところ、RF 産生に関する T 細胞機能の研究は全体としての T 細胞機能をみたものであり、今後、ヘルパー機能やサブレッサー機能などに分離してのより詳細な研究が必要とされている。また、このような研究をすすめる上で、RA の炎症局所である関節組織浸潤細胞は、今回の実験からも非常に有用な試料であると考えられた。

文 献

- 1) Holborow, E.J. : Rheumatoid factors and antinuclear antibodies. Textbook of rheumatic diseases. Edited by Scott, J. T., 5th ed., Churchill Livingstone, New York, 1978, pp. 167~189.
- 2) Möller, E., Ström, H. and Al-Balaghi, S. : Role of polyclonal activation in specific immune responses. Relevance for findings of antibody activity in various diseases. Scand. J. Immunol., 12 : 177~182, 1980.
- 3) Fudenberg, H.H. : Molecular theology, immunophilosophy, and autoimmune disease. II. Speculation on the aetiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. Scand. J. Immunol., 12 : 459~465, 1980.
- 4) Böyum, A. : Separation of lymphocytes from blood and bone marrow. Scand. J. clin. Lab. Invest., 21 : 1~109, 1968.
- 5) Galili, U. and Schlesinger, M. : The formation of stable E rosettes after neuraminidase treatment of either human peripheral blood lymphocytes or sheep red blood cells. J. Immunol., 112 : 1628~1634, 1974.
- 6) Heide, K. and Schwick, H.G. : Salt fractionation of immunoglobulins. Chap 6, Handbook of Experimental Immunology. Edited by Weir, D. M., Blackwell, Oxford, 1973, pp. 6. 1~6. 11.
- 7) Robbins, D.L., Moore, T.L., Carson, D.A. and Vaughan, J.H. : Relative reactivities of rheumatoid factors in serum and cells. Arthritis Rheum., 21 : 820~826, 1978.
- 8) Gleich, G.J., Averbeck, A.K. and Swedlund, H.A. : Measurement of IgE in normal and allergic serum by radioimmunoassay. J. Lab. Clin. Med., 77 : 690~698, 1971.
- 9) Cambiaso, C.L., Goffinet, A. and Vaerman, J. P. : Glutaraldehyde-activated aminoethyl-derivative of Sepharose 4B as a new versatile immunoadsorbent. Immunochemistry, 12 : 273~278, 1975.
- 10) Waldmann, T.A., Broder, S., Bleese, R.M., Durm, M., Blackman, M. and Strober, W. : Role of suppressor T cells in pathogenesis of common variable hypogammaglobulinemia. Lancet, 2 : 609~613, 1974.
- 11) Lea, D.J. and Ward, D.J. : Estimation of IgM

- rheumatoid factors by fluorimetry. *Ann. Rheum. Dis.*, 37 : 247~251, 1978.
- 12) Taylor-Upsahl, M.M., Johnson, P.M., Mellbye, O.J. and Natvig, J.B. : A study of complement fixation by rheumatoid factor using a haemolytic assay system. *Clin. exp. Immunol.*, 28 : 204~211, 1977.
- 13) Carson, D.A., Lawrance, S., Catalano, M.A., Vaughan, J.H. and Abraham, G. : Radioimmunoassay of IgG and IgM rheumatoid factors reacting with human IgG. *J. Immunol.*, 119 : 295~300, 1977.
- 14) Pope, R.M. and McDuffy, S.J. : IgG rheumatoid factor. Relationship to seropositive rheumatoid arthritis and absence in seronegative disorders. *Arthritis Rheum.*, 22 : 988~998, 1979.
- 15) Harisdangkul, V., McDougal, J. S., Knapp, M. and Christian, C.L. : Naturally occurring low molecular weight IgM in patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and macroglobulinemia. I. Purification and immunologic studies. *J. Immunol.*, 115 : 216~222, 1975.
- 16) Fyrand, O., Mellbye, O.J. and Natvig, J.B. : Immunofluorescence studies for immunoglobulins and complement C3 in synovial joint membranes in psoriatic arthritis. *Clin. exp. Immunol.*, 29 : 422~427, 1977.
- 17) Vaughan, J.H., Chihara, T., Moore, T.L., Robins, D.L., Tanimoto, K., Johnson, J.S. and McMillan, R. : Rheumatoid factor-producing cells detected by direct hemolytic plaque assay. *J. Clin. Invest.*, 58 : 933~941, 1976.
- 18) Taylor-Upsahl, M.M., Abrahamsen, T.G. and Natvig, J.B. : Rheumatoid factor plaque-forming cells in rheumatoid synovial tissue. *Clin. exp. Immunol.*, 28 : 197~203, 1977.
- 19) Tsoukas, C.D., Carson, D.A., Fong, S., Pasquali, J. and Vaughan, J.H. : Cellular requirements for pokeweed mitogen-induced autoantibody production in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.*, 125 : 1125~1129, 1980.
- 20) Koopman, W.J. and Schrohenloher, R.E. : Enhanced in vitro synthesis of IgM rheumatoid factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 23 : 985~992, 1980.
- 21) Pasquali, J., Tsoukas, C.D., Vaughan, J.H. and Carson, D.A. : Selective lymphocyte deficiency in seronegative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 24 : 770~773, 1981.
- 22) Izui, S., Eisenberg, R.A. and Dixon, F.J. : IgM rheumatoid factors in mice injected with bacterial lipopolysaccharides. *J. Immunol.*, 122 : 2093~2102, 1979.
- 23) Slaughter, L., Carson, D.A., Jensen, F.C., Holbrook, T.L. and Vaughan, J.H. : In vitro effects of Epstein-Barr virus on peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis and normal subjects. *J. Exp. Med.*, 148 : 1429~1434, 1978.