原発性免疫不全症における B 細胞増殖能

大崎 和弥・満屋 裕明*・岸 本 進*

絹脇 悦生**・玉利 秀夫***

Proliferative responsiveness of B cells in primary immunodeficiency

Kazuya Osaki, Hiroaki Mitsuya*, Susumu Kishimoto*,
Etsuo Kinuwaki** and Hideo Tamari***

*The Second Department of Internal Medicine, Kagoshima University,
School of Medicine, Kagoshima*

**The Second Department of Internal Medicine, Kumamoto University,
School of Medicine, Kumamoto*

***Kumamoto Central Hospital, Kumamoto*

****Pediatrics, Kumamoto University, School of Medicine, Kumamoto*

【Summary】

Proliferative responsiveness of B cells from 7 patients with primary immunodeficiency was studied. The used mitogens were F(ab')₂ fragment sheep anti-human IgGF (ab')₂ fragment (ā-IgGF(ab')₂), Staphylococcus aureus Cowan I (STA) and Epstein Barr virus (EBV). The results obtained are as follows.

- 1) In common variable hypogammaglobulinemia (3 cases), B cells from 2 patients showed markedly decreased responses to all the used mitogens, while those from one patient showed normal responses. The decreased responses to mitogens were not restored by depletion of adherent cells.
- 2) In IgA-deficiency (2 cases), B cells from one patient associated with juvenile rheumatoid arthritis showed decreased responses to all the mitogens, while those from the other showed normal responses.
- 3) In immunodeficiency with hyper IgM (one case) and IgM-deficiency (one case), the mitogen responses of B cells were almost normal except the slight decreased response to STA.

Key words : primary immunodeficiency

B cell proliferation

ā-IgGF(ab')₂

Staphylococcus aureus Cowan I (STA)

Epstein-Barr virus (EBV)

【概 要】

T-cell independent B cell mitogen である F(ab')₂ fragment sheep anti-human IgGF(ab')₂ fragment (ā-IgGF(ab')₂), Staphylococcus aureus Cowan I (STA) および Epstein Barr virus (EBV) を用いて、原発性免疫不全患者の B cell 増殖能を検討した。common variable hypogammaglobulinemia 3 例のうち 2 例では用いた mitogen すべてに対し B cell 増殖能の障害を認めたが、1 例では正常と同等の反応を認めた。この抑制された mitogen response は adherent cell を除去しても回復しなかった。また若年性関節リウマチを合併した IgA-deficiency の 1 例でもすべての mitogen response の低下を認めたが、他の 1 例では正常であった。immunodeficiency with hyper IgM の 1 例と IgM-deficiency の 1 例では軽度の STA 反応の低下を除きほぼ正常の反応性を示した。

I. はじめに

生体内免疫応答は免疫担当細胞間の複雑な immune network によって制御されている。experiment of nature としての原発性免疫不全患者の免疫学的解析を行うことは、免疫担当細胞の分化成熟過程および機能あるいは細胞間相互作用の機序の解明に対して有力な情報を提供する。

われわれは in vitro の pokeweed mitogen (PWM) あるいは Epstein Barr virus (EBV) 刺激免疫グロブリン産生試験を用いて、ある type の原発性免疫不全症では suppressor T cell 機能の亢進や helper T cell 機能の低下の存在に加え、B cell 機能の異常が存在することを報告した^{1,2)}。

今回、免疫グロブリン産生低下の機序をさらに解析するために、T cell independent B cell mitogen である抗ヒト免疫グロブリン抗体^{3,4)}、Staphylococcus aureus Cowan I strain (STA)^{5,6)} および EBV⁷⁾ を用いて原発性免疫不全患者の B cell 増殖能を検討し、若干の新知見を得たので考察を加えて報告する。

II. 対象と方法

1. 対 象

原発性免疫不全患者 7 例および健常者 11 例について検討した。原発性免疫不全患者は、common variable hypogammaglobulinemia (CVH) 3 例、immunodeficiency with hyper IgM (IDcM) 1 例、IgA-deficiency (IgA-D) 2 例、IgM-deficiency (IgM-D) 1 例であった。IgA-D のうち 1 例 (IgA-D-1) は若年性関節リウマチを合併しステロイドの長期投与をうけていたが、他の患者ではとくに重篤な合併症は認めなかった。

2. リンパ球の分離

ヘパリン加末梢血から Ficoll-Conray (比重 1.078) を

用いた比重遠心法で末梢血単核細胞を分離した。末梢血単核細胞中のリンパ球の比率は通常 83% 以上であり、viability は 98% 以上であった。

3. リンパ球 subpopulation の算定および T cell, B cell の分離

ノイラミダーゼ処理ヒツジ赤血球 (En) とのロゼット法²⁾により T cell の比率を求め、B cell の比率は、末梢血単核細胞を pH 4.0 の酢酸バッファーで 1 分間処理後 FITC 標識抗ヒト IgG, IgA あるいは IgM 重鎖抗体を用いて算定した。

Ficoll Conray を用いて分離した En ロゼット形成細胞に 0.83% 塩化アンモニウムバッファーを加え En を溶血させて T cell 分画を得た。B cell 分画は、純度を高めるために非 En ロゼット形成細胞分画を再度ロゼット形成をさせて、Ficoll Conray を用いて En ロゼット形成細胞を除去して得た。この再ロゼット法により、B cell 分画は 45~55% の表面免疫グロブリン保有細胞を含み、T cell は 5% 以下、単球は 25~40% 含まれていた。上記の方法で得られた各リンパ球分画は 10% fetal calf serum (FCS) (Grand Island Biological Co., Grand Island, N.Y.) 添加 RPMI 1640 (Nissui Seiyaku) に浮遊、 1×10^6 /ml の細胞濃度に調整した。

4. adherent cell の除去

B cell 分画を 1×10^6 /ml の濃度で 3~5 ml を Petri Dish (Falcon 1001) に入れ、37°C の 5% CO₂ incubator 内に 1 時間静置後 non-adherent cell を得た。同様の操作を再度行なった後、non-adherent cell を 10% FCS 添加 RPMI 1640 に浮遊、 1×10^6 /ml に再調整した。この方法による単球の混入率は 5% 以下であった。

5. mitogen

F(ab')₂ fragment sheep anti-human IgGF(ab')₂ fragment (ā-IgGF(ab')₂) (Cappel Laboratories, U.S.A.) は 200 μg/ml の至適濃度で、STA (Pansorbin; Calbio-

chem-Behring Corp., La Jolla, Calif.) は最終濃度 0.01 % の至適濃度で用いた。EBV は B-95-8 marmoset cell line から得られた培養上清の 100 倍濃縮液⁸⁾を用い、その 10 μ l をリンパ球浮遊液 100 μ l (1×10^6 /ml) に添加した。

6. リンパ球増殖能の検討

Falcon の microplate に 1×10^6 /ml の T cell あるいは B cell 浮遊液 100 μ l を triplicate で加え、至適濃度の mitogen を添加後 5% CO₂ incubator で 72 時間培養し、³H]-thymidine 0.5 μ Ci を 16 時間 pulse 後リンパ球を multiple sample harvester で回収した。³H]-thymidine の核内 DNA へのとりこみは液体シンチレーションカウンターで測定した。

III. 結 果

1. 原発性免疫不全患者の末梢血リンパ球 subpopulation (表 1)

原発性免疫不全患者 7 例と健常者 18 例の血清免疫グロブリン値、リンパ球数および末梢血リンパ球 subpopulation を表 1 に示した。En ロゼット形成細胞は CVH-2 の 1 例を除きほぼ正常であった。表面免疫グロブリン保有細胞については、IgA 保有細胞が CVH-1 で 1% と低下し IDcM で 7% と増加を認める以外はほぼ

正常であった。

2. B cell mitogen の T cell 非依存性 (図 1)

7 例の健常者末梢血より分離した 1×10^5 個の T cell, B cell あるいは B cell (1×10^5 個)+T cell (1×10^5 個)の分画に $\bar{a}$ -IgGF(ab')₂, STA あるいは EBV をそれぞれ添加すると、B cell では著明な ³H]-thymidine のとりこみがおこったが T cell ではほとんど認められなかった。この B cell に T cell を加えて同様の実験を行なったが B cell 単独でのとりこみとほとんど変わらなかった。

3. B cell mitogen に対する B cell 増殖能の kinetics (図 2)

健常者 3 例の B cell に $\bar{a}$ -IgGF(ab')₂, STA あるいは EBV を添加後 ³H]-thymidine のとりこみをみるとほぼ 3 日めに peak または plateau に達したので、以降の検索はすべて 3 日間の培養後 ³H]-thymidine の pulse を行ない比較検討した。

4. B cell mitogen の至適濃度の検討 (図 3)

健常者より得られた B cell に種々の濃度で mitogen を添加し ³H]-thymidine のとりこみをみると $\bar{a}$ -IgGF(ab')₂ は 200 μ g/ml, STA は 0.01%, EBV は 100 倍濃縮液の原液 10 μ l の添加でほぼ peak を認めた。 $\bar{a}$ -IgGF(ab')₂ に関しては、図には示していないが別の実験で 600 μ g/ml の濃度まで plateau を示した。

表 1 原発性免疫不全患者における血清免疫グロブリン値およびリンパ球 subpopulation

Patients	Age	Serum immunoglobulins (mg/dl)			Lymphocyte count (/ μ l)	En-RFC ^{a)} (%)	Surface immunoglobulins ^{b)} (%)		
		G	A	M			G	A	M
CVH-1 : K.M.	22	6	19	9	2,964	74.0	3.1	1.0	5.0
CVH-2 : S.S.	16	40	0	0	1,050	40.2	3.5	4.5	5.0
CVH-3 : Y.S.	7	241	33	83	5,500	65.2	N.D. ^{d)}	N.D.	N.D.
IDcM : M.H.	29	246	0	821	3,200	76.4	3.0	7.0	3.0
IgA-D-1 : A.I.	8	915	0	92	1,456	74.8	3.5	3.6	5.5
IgA-D-2 : H.K.	45	1,000	0	50	2,070	72.0	3.2	2.6	3.0
IgM-D : T.F.	52	1,053	50	0	1,012	65.0	2.5	3.2	4.0
normal individuals ^{c)}	24- 35	900- 1,602	135- 309	78- 214	2,213 $\pm 1,276$	76.2 ± 10.6	3.2 ± 1.4	3.2 ± 1.4	4.6 ± 1.7

a) T cells were assayed by counting the En-rosette forming cells (En-RFC) in the presence of fetal calf serum at 4°C.

b) B cells were determined by counting surface Ig-bearing lymphocytes. Before assay, PBL were exposed to pH 4.0 acetate buffer for 1 min.

c) The numbers represent the means ± 1 S.D. of values from 18 normal subjects.

d) not done

図1 B cell mitogen の T cell 非依存性

$[\text{^3H}]$ -thymidineのとりこみ(Δcpm)は片対数にて表わした(Mean $\pm$ 2SE)

図2 B cell mitogen に対する B cell 増殖能の kinetics

5. STA に対する B cell の増殖能 (図4)

健常者 (n=11) の STA 刺激による $[\text{^3H}]$ -thymidine のとりこみは $25,483 \pm 6,460 \Delta\text{cpm}$ (Mean $\pm$ 2SE) であったのに対し, CVH-1 と CVH-2 および若年性関節リウマチを合併した IgA-D-1 の1例ではそれぞれ 69,0 およ

び 78 Δcpm と著明な低下を認めた. IDcM および IgM-D の症例でもそれぞれ 4,598 および 6,533 Δcpm と軽度の低下を認めたが, CVH-3 および IgA-D-2 の症例ではとくに異常を認めなかった.

6. $\alpha\text{-IgGF(ab')}_2$ に対する B cell の増殖能 (図5)

健常者 (n=11) の $\alpha\text{-IgGF(ab')}_2$ 刺激による $[\text{^3H}]$ -thymidine のとりこみは $4,898 \pm 3,120 \Delta\text{cpm}$ (Mean $\pm$ 2SE) であったが, CVH-1, CVH-2 および IgA-D-1 の症例ではすべて 0 Δcpm と著明な低下を認めた. 一方, IgM-D の1例では STA に対する反応性の低下を認めたにもかかわらず, $\alpha\text{-IgGF(ab')}_2$ に対する反応性は 6,889 Δcpm とほぼ正常であった.

7. EBV に対する B cell の増殖能 (図6)

健常者 (n=7) の B cell の $[\text{^3H}]$ -thymidine のとりこみは $20,364 \pm 9,674 \Delta\text{cpm}$ (Mean $\pm$ 2SE) であったが, CVH-1, CVH-2 および IgA-D-1 の症例でそれぞれ 4,2,549 および 0 Δcpm と著明に低下していた.

8. STA および EBV に対する反応性における adherent cell 除去の影響 (図7)

B cell mitogen に対するリンパ球増殖能の低下に suppressor macrophage が関与しているかを検討するために, B cell 分画から adherent cell を除去しその影響をみた. CVH-1 および CVH-2 の2例では特に反応性の回復を認めず B cell 自体の機能異常が考えられた.

IV. 考 按

1972 年代後半から急速に進展した細胞工学を用いた

EBV は B-95-8 marmoset cell line から得られた培養上清の 100 倍濃縮液を原液とし、種々の濃度に希釈後、その $10 \mu\text{l}$ をリンパ球浮遊液に添加した。

図 3 B cell miogen の至適濃度の検討

図 4 STA に対する B cell の増殖能

解析により、B cell の分化成熟の過程には抗原や mitogen などの第 1 シグナルのほかに B cell growth factor や T cell replacing factor などの第 2 シグナルの必要が示され、B cell の増殖と分化が別個の因子によって調節されていることが明らかにされてきた。今回われ

われが検討した症例は PWM 刺激免疫グロブリン産生試験で全例 B cell に分化成熟障害が存在することが確認されているが¹⁾、PWM 刺激免疫グロブリン産生には第 2 シグナル発現のため B cell の分裂・増殖が必要と考えられており、B cell mitogen を用いた今回の成績が

図 5 $\bar{a}$ -IgGF (ab')₂ に対する B cell の増殖能

図 6 EBV に対する B cell の増殖能

ら一部の症例では分化成熟障害のみならず増殖能にも障害があると思われた。さらに CVH 2 例では macrophage を除去しても反応性の回復を認めなかったことから, suppressor macrophage による抑制ではなく B cell 自体の機能異常によると思われた。

一方, 最近 Chen ら⁹⁾は *Salmonella typhi* B のホルマリン固定菌体を正常ヒト B cell に作用させると, DNA 合成をおこさず T cell 非存在下で免疫グロブリン

の合成をもたらすことを観察し, この mitogen に反応する細胞は免疫グロブリン分泌細胞の“immediate precursor”であろうとしている。さらに彼らは CVH の患者 B cell ではこの mitogen で刺激しても何ら免疫グロブリン産生をおこさなかったとして, CVH 患者では“immediate precursor”が欠損しているとした。しかし本症例の CVH-1 と CVH-2 の B cell は EBV 刺激で有意の DNA 合成をおこさなかったものの, いずれも

図7 STA および EBV に対する反応性における adherent cell 除去の影響

EBV 刺激によって IgM は正常 B cell と同等に産生している¹⁾。このことは Chen らの観察と異なり、これらの CVH 症例でも EBV 反応性の IgM 産生細胞の “immediate precursor” が正常数存在することをうかがわせる。このような観察結果の違いは用いる刺激因子が異なることによる可能性もあるが、いずれにしろ mitogen 刺激によるヒト B cell の分化と増殖との相互関連についてさらに検討が必要だと思われる。

B cell mitogen の target cell に関しては、STA は C₃ receptor および表面免疫グロブリン (とくに IgM および IgG) 保有細胞^{5,10)}、a-IgGF(ab')₂ は表面免疫グロブリン保有細胞^{3,4)}、EBV でも表面免疫グロブリン保有細胞⁷⁾とされている。しかし最近 Fu らは pre-B cell も EBV の target cell となりうることを報告している¹¹⁾。IgM-D の 1 例では STA 反応性のみ軽度の低下を認めたが、これは IgM 保有細胞の機能異常による可能性があり、また IDcM の軽度の STA 反応性の低下も IgG bearing cell の機能異常によるかもしれない。今後は各 Ig class あるいは Ig subclass 別での B cell subsets についての詳細な検討が必要と思われる。

なお、健常者 B cell 分画から adherent cell を除去した時の EBV および STA 反応性低下の原因については、macrophage による補助作用が失われたことによる可能性もあるが、background cpm が平均約 6,000 cpm と高かったことによると思われる。

原発性免疫不全症のある type では suppressor T cell 機能の亢進¹²⁻¹⁵⁾あるいは helper T cell 機能の低下¹⁶⁻¹⁸⁾が報告されており、低γグロブリン血症の原因としての可能性が示唆されている。一方、T cell 機能は正常で B cell 機能に異常を認める報告も多い^{6,16-20)}。今回、原発性免疫不全症患者の一部では B cell の分化成熟障害のみならず増殖能にも障害があることを報告したが、今後 B cell に対する monoclonal antibody や T cell growth factor あるいは T cell replacing factor などを用いたヒト B cell の分化についての解析がすすめば、原発性免疫不全症の発症機序もさらに明らかになるものと思われる。

本論文の要旨は、第9回日本臨床免疫学会総会 (1981年、東京) において発表した。

文 献

- 1) Mitsuya, H., Osaki, K., Tomino, S., Katsuki T. and Kishimoto, S.: Pathophysiologic analysis of peripheral blood lymphocytes from patients with primary immunodeficiency. 1. Ig synthesis by peripheral blood lymphocytes stimulated with either pokeweed mitogen or Epstein-Barr virus in vitro. *J. Immunol.*, 127: 311~315, 1981.
- 2) Mitsuya, H., Tomino, S., Hisamitsu, S. and Kishimoto, S.: Evidence for the failure of IgA specific T helper activity in a patient with immunodeficiency with hyper-IgM. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 2: 337-342, 1979.
- 3) Henriksen, A., Godal, T. and Landaas, T.φ.: Mitogenic effect on human lymphocytes of insolubilized anti-immunoglobulins. 1. Specificity of the stimulating agent. *J. Immunol.*, 124: 921-925, 1980.
- 4) Gausset, P., Delespesse, G., Hubert, C. et al.: In vitro response of subpopulations of human lymphocytes. II. DNA synthesis by anti-im-

- munoglobulin antibodies. *J. Immunol.*, 116 : 446-453, 1976.
- 5) Shuurman, R.K.B., Gelfand, E.W. and Dosch, H.-M. : Polyclonal activation of human lymphocytes in vitro. I. Characterization of the lymphocyte response to a T cell-independent B cell mitogen. *J. Immunol.*, 125 : 820-825, 1980.
 - 6) Sirianni, M.C., Pucillo, L.P., Fiorilli, M. et al. : Formalin-treated bacteria as selective B cell mitogens: results in primary and acquired immunodeficiencies. *Clin. Exp. Immunol.*, 45 : 393-398, 1981.
 - 7) Kirschner, H., Tosato, G., Blases, R.M., Broder, S. et al. : Polyclonal immunoglobulin secretion by human B lymphocytes exposed to Epstein-Barr virus in vitro. *J. Immunol.*, 122 : 1310-1313, 1979.
 - 8) Katsuki, T. and Hinuma, Y. : Characteristics of cell lines derived from human leukocytes transformed by different strains of Epstein-Barr virus. *Int. J. Cancer*, 15 : 203-210, 1975.
 - 9) Chen, W.Y., Munoz, J., Fudenberg, H.H., Tung, E. and Virella, G. : Polyclonal activation of human peripheral blood B lymphocytes by formaldehyde-fixed salmonella paratyphi B. *J. Exp. Med.*, 153 : 365-374, 1981.
 - 10) Harada, H., Kasahara, T., Ogata, K., Nakano, K., Morita, M. and Kawai T. : Effect of *Staphylococcus aureus* Cowan I (SpA Cow I) bacteria on human B cell subsets: proliferative response and immunoglobulin (Ig) production. *Jpn. J. Clin. Immunol.*, 5 : 66-75, 1982.
 - 11) Fu, S.M., Hurley, J.N., McCune, J.M., Kunkel, H.G. and Good, R.A. : Pre-B cells and other possible precursor lymphoid cell lines derived from patients with X-linked agammaglobulinemia. *J. Exp. Med.*, 152 : 1519-1526, 1980.
 - 12) Waldmann, T.A., Broder, S., Blaese, R.M., Durm, M., Blackman, M. and Strober, W. : Role of suppressor T-cells in the pathogenesis of common variable hypogammaglobulinemia. *Lancet* II, 609-613, 1974.
 - 13) Waldmann, T.A., Broder, S., Blackman, M., Krakauer, R. and Meade, B. : Suppressor T cells in the pathogenesis of hypogammaglobulinemia associated with a thymoma. *Trans. Assoc. Am. Physicians*, 88 : 120-134, 1975.
 - 14) Broom, B.C., DeLaConcha, E.G., Webster, A.D.B. and Janossy, G.L. : Intracellular immunoglobulin production in vitro by lymphocytes from patients with hypogammaglobulinemia and their effect on normal lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 23 : 73-77, 1976.
 - 15) Siegal, F.P., Siegal, M. and Good, R.A. : Suppression of B-cell differentiation by leukocytes from hypogammaglobulinemic patients. *J. Clin. Invest.*, 58 : 109-122, 1976.
 - 16) Siegal, F.P., Siegal, M. and Good, R.A. : Role of helper, suppressor T and B-cell defects in the pathogenesis of the hypogammaglobulinemia. *N. Engl. J. Med.*, 299 : 172-178, 1978.
 - 17) Seeger, R.C., Robins, R.A., Stevens, R.H., Klein, R.B., Waldmann, D.J., Zeltzer, P.M. and Kessler, S.W. : Severe combined immunodeficiency with B lymphocytes: In vitro correction of defective immunoglobulin production by addition of normal T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 26 : 1-10, 1976.
 - 18) De La Concha, E.G., Oldham, G., Webster, A.D.B., Asherson, G.L. and Platts-Mills, T.A.E. : Quantative measurements of T- and B-cell function in 'variable' primary hypogammaglobulinemia: evidence for a consistent B-cell defect. *Clin. Exp. Immunol.*, 27 : 208-215, 1977.
 - 19) Ashman, R.F., Saxon, A. and Stevens, R.H. : Profile of multiple lymphocyte functional defects in acquired hypogammaglobulinemia, derived from in vitro cell recombination analysis. *J. Alle. Clin. Immunol.*, 65 : 242-256, 1980.
 - 20) Geha, R.S., Hyslop, N., Alami, S., Farah, F., Schneeberger, E.E. and Rosen, F.S. : Hyper immunoglobulin M immunodeficiency (dysgammaglobulinemia); presence of immunoglobulin M-secreting plasmacytoid cells in peripheral blood and failure of immunoglobulin M-immunoglobulin G switch in B-cell differentiation. *J. Clin. Invest.*, 64 : 385-391, 1979.