単クローン性 γ -グロブリン血症における末梢血 B細胞の産生する Ig の単クローン化に関する研究

井石 安比古・小阪 昌明・岡川 和人・星島 康男

Jpn. J. Clin. Immun., 9 (4) : 265~274, 1986.

The monoclonality of immunoglobulin produced by B cells in the peripheral blood from patients with monoclonal gammopathy

Yasuhiko Iishi, Masaaki Kosaka, Kazuto Okagawa and Yasuo Hoshijima

The First Department of Internal Medicine, School of Medicine, The University of Tokushima

【Summary】

The monoclonality of immunoglobulin (Ig) produced by B cells in the peripheral blood was investigated in patients with myeloma, macroglobulinemia and benign monoclonal gammopathy (BMG) to evaluate the presence of monoclonal B cells. The lymphocytes were cultured with or without pokeweed mitogen (PWM) for seven days, and allogenic co-culture of B cells and T cells was performed to determine the effect of T cell function on the Ig production by monoclonal B cells. The IgG, IgA, IgM and κ/λ ratio of each class produced and released into the culture medium by B cells were measured by enzyme immunoassay, and the increment of monoclonal Ig was assigned by the deviation of κ/λ ratio of light chain of the Ig. The monoclonal change in the Ig production by B cells in the peripheral blood was observed both in myeloma and in macroglobulinemia, although the increment was more significant in macroglobulinemia than in myeloma. In contrast, such change was not observed in BMG. The Ig production by monoclonal B cells in the peripheral blood from myeloma patients was not enhanced by the addition of PWM. Furthermore, the kinetics of the Ig production by monoclonal B cells showed a linear increase that was different from biphasic pattern with exponential increase of Ig production by normal B cells during the late period of the culture. It was suggested that the Ig production by monoclonal B cells was not dependent on the helper-T cell function in myeloma. When the monoclonal B cells were co-cultured with normal T cells in place of myeloma T cells, the monoclonal Ig production was not enhanced. This result also suggests that the Ig production by monoclonal B cells was not influenced by suppressor cells (Leu 2a⁺ Leu 7⁺) that was shown in our previous report to increase in the peripheral blood of myeloma patients. It is concluded that patients with myeloma and macroglobulinemia have a B cell clone in the peripheral blood which can independently differentiate into the monoclonal Ig-secreting cell without participation of immuno-regulatory cells.

Key words: myeloma,
macroglobulinemia,
benign monoclonal gammopathy,
monoclonality of B cell,
 κ/λ ratio of light chains of the Ig

【概 要】

骨髓腫、マクログロブリン血症および良性M蛋白血症 (BMG) の患者について、末梢血リンパ球が *in vitro* で産生する Ig の κ/λ 比と産生動態を検討した。骨髓腫ではB細胞の産生 Ig に単クローン化が観察され、マクログロブリン血症ではさらに著明な単クローン化が認められた。BMG では単クローン化は認められなかった。骨髓腫患者の末梢血の単クローン性B細胞によるM蛋白の産生は、PWM の添加によっても増加せず、経時的産生動態も正常人で2相性であるのとは異なり直線的で、M蛋白産生には helper T 細胞を必要としないと考えられた。また、M蛋白の産生量は正常人T細胞の添加によっても変化せず、骨髓腫で増加している抑制性細胞 (Leu 2a⁺ Leu 7⁺) の影響も受けないと考えられた。以上の成績は、骨髓腫とマクログロブリン血症では末梢血B細胞に単クローン化が存在し、それらは免疫調節細胞の関与なしにM蛋白分泌細胞に分化しうることを示すものである。

I. はじめに

骨髓腫およびマクログロブリン血症は、B細胞系細胞の最終分化段階である免疫グロブリン (Ig) 分泌細胞の腫瘍性増殖を共通の特徴とするB細胞腫瘍であり、未分化な段階で腫瘍化し、その細胞分化が凍結されているB細胞性急性白血病やB細胞性悪性リンパ腫とは腫瘍化の様相が異なっている¹⁾。したがって、B細胞系細胞の terminal cell の腫瘍であるこれらの疾患において、未分化な段階のB細胞の単クローン化の有無と程度を知るとは、その腫瘍細胞の起源や腫瘍化のメカニズムを明らかにするうえで重要と考えられる。

われわれは、本研究において、Ig 分泌細胞の precursor である末梢血B細胞について、その単クローン化の有無を検索した。すなわち、上記2疾患患者の末梢血リンパ球を *in vitro* で培養し、その上清中に産生される Ig 量を各クラス別、 κ 型、 λ 型別に enzyme immunoassay (EIA) 法により定量し、その κ/λ 比の偏りを、B細胞の単クローン化の指標とした。また、疾患対照として良性Mタンパク血症 (BMG) についても同様の検討を行った。

II. 対象と方法

1. 対象 (表1)

対象は、IgG 骨髓腫8例 (κ 型6, λ 型2), IgA 骨髓腫2例 (κ 型1, λ 型1), マクログロブリン血症4例 (いずれも κ 型), BMG 3例 (κ 型1, λ 型2) の計17例である。年齢は26~78歳 (平均63歳), 男性12例女性5例であった。対照として正常人8例についても検討した。

2. 方 法

1) 末梢血リンパ球の培養法

患者または正常人のヘパリン加末梢血から Ficoll Conray (比重1.077) 比重遠沈法 (380×g, 30分間) を用いて単核球を分離し、リンパ球分画とした。これを10% ウシ胎児血清加培養液 RPMI 1640 (Streptomycin 25 μ g/ml, Penicillin 25 U/ml を含む) に 1×10^6 cells/ml の濃度に浮遊し、5%炭酸ガス培養器で 37°C, 7日間培養した。各症例につき pokeweed mitogen (PWM; E.Y. Labo., San Mateo, CA) 5 μ g/ml を培養液に加えたものと、加えないものの2種の培養を行った。培養終了後上清を採取し、Ig 濃度測定まで -20°C で凍結保存した。一部の症例では、培養時間を3日、5日あるいは7日間として、Ig 産生量の経時変化も検討した。なお培養に用いた単核球の一部を用いて、塗末標本を作成し、ライト・ギムザ染色を行い約千個の細胞を検鏡したが、リンパ球89.8~94.8%, 単球3.6~8.6%, 顆粒球0~1.6% で、形態学的に形質細胞と思われる細胞の混入は認められなかった。

2) T細胞とB細胞の混合培養

単球を除去するために、5%シリカゲル(ワコーゲル, LC-SH, 和光純薬)/0.15Mリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)をヘパリン加末梢血に1/10量加え、37°C 1時間解置した。その後、上述のごとく比重遠沈法でリンパ球を分離し、ノイラミニダーゼ (Behringwerke AG, Marburg) 処理ヒツジ赤血球 (SRBC) と混和後、4°C 1時間解置した。ついで、このリンパ球をマウスリンパ球比重分離液 (M-SMF, 比重1.090, 日本抗体研究所) を用いた比重遠沈法で, sheep erythrocyte rosette forming cell (ERFC) と non-ERFC とに分画した。この ERFC と non-ERFC

表 1 症例の臨床検査成績

Case	Age (yr)	Sex	Diagnosis	Ly. count (/ μ l)	IgG in serum (g/dl)	IgA	IgM	SmIg ⁺ cell %	κ/λ	B.M.NCC ($\times 10^4/\mu$ l)	plasma cell %
1.	67	M	M.M.G (κ)	756	7.8	0.01	0.07	2.8	8.3	14.9	52
2.	72	M	M.M.G (κ)	1,836	3.8	0.03	0.03	n.t.	n.t.	7.0	7
3.	64	M	M.M.G (κ)	2,257	9.7	0.03	0.04	9.0	2.1	3.6	39
4.	61	F	M.M.G (κ)	2,376	10.9	0.1	0.03	18.0	1.5	4.6	6
5.	72	F	M.M.G (κ)	416	3.9	0.1	0.05	17.1	2.9	1.8	10
6.	67	M	M.M.G (λ)	1,700	9.2	0.03	0.01	6.2	0.5	20.7	49
7.	78	M	M.M.A (κ)	1,404	0.8	7.1	0.04	n.t.	n.t.	12.7	41
8.	47	M	M.M.A (λ)	3,479	0.5	4.1	0.01	25.1	0.7	1.5	5
9.	73	M	M.M.G (κ)	3,042	5.6	0.03	0.2	2.1	1.6	1.9	11
10.	60	M	M.M.G (λ)	3,201	4.3	0.02	0.04	n.t.	n.t.	10.1	0.4
11.	51	F	W.M. (κ)	2,135	1.3	0.1	5.3	23.0	∞	2.4	14
12.	70	M	W.M. (κ)	1,512	3.1	0.2	3.3	21.0	3.0	20.0	44
13.	26	M	W.M. (κ)	2,772	0.6	0.04	4.2	58.4	19.9	12.5	25
14.	68	M	W.M. (κ)	1,512	1.7	0.1	2.0	20.4	5.0	6.0	0.4
15.	61	F	BMG G (κ)	3,864	1.9	0.3	0.1	n.t.	n.t.	40.3	6
16.	71	F	BMG G (λ)	2,385	2.6	0.06	0.1	19.4	1.0	10.3	4
17.	66	M	BMG G (λ)	4,032	2.8	0.06	0.04	19.5	0.3	17.0	10

M.M. : multiple myeloma, W.M. : Waldenström's macroglobulinemia

BMG : benign monoclonal gammopathy, B.M. : bone marrow,

n.t. : not tested, NCC : nucleated cell count

をそれぞれT細胞分画, B細胞分画とし, いずれも 1×10^6 cells/ml の濃度で 10% ウシ胎児血清加 RPMI 1640 (PWM 5 μ g/ml 含) に浮遊した. T細胞分画とB細胞分画を 1 : 1 に混合して, 上述のごとく培養後, 上清を採取し, Ig 濃度測定まで -20°C に凍結保存した. なお用いたT細胞分画, B細胞分画の純度を, SRBC によるロゼット形成能とペルオキシダーゼ染色により検定したところ, それぞれ 90~93%, 83~98% の純度であった.

3) 培養上清中の Ig 濃度とその κ 型, λ 型別濃度の測定法

各クラスの Ig 濃度および, それぞれの κ 型, λ 型別の Ig 濃度の測定は著者ら²⁾ がすでに発表したポリスチレンビーズを固相とするサンドイッチ法による EIA で測定した.

すなわち, 前もって抗ヒト IgG, 抗ヒト IgA または抗ヒト IgM ヤギ抗体 (Cappel, Cochranville, PA) をそれぞれコートしたポリスチレンビーズに標準液(後述)もしくは培養上清を加え, 4°C 16 時間反応させたのち洗浄した. さらに, 各クラス別の Ig 濃度の測定には 4,000~8,000 倍希釈のペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG, 抗ヒト IgA または抗ヒト IgM ヤギ F (ab')₂ 抗体 (Cappel) をそれぞれ加え, 各クラスの κ 型, λ 型別 Ig 濃度の測定には抗ヒト κ 鎖または抗ヒト λ 鎖ヤギ F (ab')₂ 抗体

(Cappel) を加えた. 4°C 16 時間反応後洗浄し, H_2O_2 , オルトフェニレンジアミン (片山化学) を用いて発色させ, 波長 492 nm で吸光度を測定し, 各 Ig の標準曲線から培養上清の Ig 濃度を求めた. 各クラス別の Ig 濃度の標準液には LC-V または LC-A (Behringwerke) を用いた. その κ 型または λ 型別 Ig 濃度の標準液には, それぞれ各 5 名の IgG, IgA 骨髄腫およびマクログロブリン血症の患者血清から分離精製した κ 型または λ 型の M 蛋白を, クラス, 型別にそれぞれ等量ずつ混合し, その濃度を上記クラス別 Ig の EIA 測定法で定量したものをを用いた.

4) リンパ球表面 Ig 保有細胞 (SmIg⁺細胞) の検索

上記のごとく末梢血より分離した単核球を, 血清を含まない RPMI 1640 に 4 時間解置し, 洗浄したのち, FITC 標識抗ヒト γ , 抗ヒト α , 抗ヒト μ , 抗ヒト δ , 抗ヒト κ または抗ヒト λ 鎖ウサギ F (ab')₂ 抗体 (Cappel) とそれぞれ混合し, 4°C 30 分間反応させ, 直接蛍光抗体法で染色した. 染色した単核球を, 蛍光顕微鏡 (Karl-Zeiss, West Germany) 下で観察し, 総リンパ球数に対するそれぞれのクラス, タイプの陽性リンパ球の比率を求めた.

図1 Ig 産生分泌動態の経時的変化

3. 統計処理

一部の成績は平均値±標準偏差で示し、有意差の検定はt検定で行った。

III. 結 果

1. 末梢血リンパ球の培養上清中の産生 IgG 量の経時的変化の検討

図1には正常人と骨髄腫患者の代表例各2例を示した。正常人では、PWM 非添加の条件下の産生 IgG 量は、それぞれ3日後1,250, 122, 5日後1,450, 390, 7日後1,920, 790 ng/ml/ 1×10^6 cells と少量の IgG の産生が認められた。PWM 添加の条件下では、それぞれ3日後1,260, 174, 5日後2,325, 202, 7日後6,575, 2,310 ng/ml と1～5日後までの少量の Ig 産生しか認められない第1相と、5～7日後の指数関数的な Ig 産生増加を認める第2相との、2相性の Ig 産生動態が認められた。これに対し骨髄腫患者 (IgG κ 型, IgG λ 型各1例) では、PWM 非添加の条件下で、それぞれ3日後1,180, 7,335, 5日後3,850, 8,375, 7日後4,850, 9,500 ng/ml と、直線的な IgG 産生増加が認められた。7日後の IgG の κ/λ 比は 9.3, 0.23 で産生された IgG のほとんどがM成分に相当する IgG であった。PWM

添加の条件下では、case 2 の産生 Ig 量は3日後2,250, 5日後3,850, 7日後12,000 ng/ml と正常人の場合と同様に5～7日後にかけて指数関数的な IgG 産生増加を認めた。しかし、その κ/λ 比は 2.0 で、増加した IgG は正常リンパ球による多クローン性の Ig, すなわち residual Ig の産生増加によるものと考えられた。一方、case 6 では PWM 非添加の条件下と、ほぼ同様の結果であった。

2. 末梢血リンパ球の培養上清中に産生された各クラス Ig の濃度とその κ/λ 比

いずれも7日間の培養の成績を示した。正常人の末梢血リンパ球の培養上清中の Ig 濃度 (図2) は、PWM 非添加の条件下では、63～4,500 ng/ml と少なく、各 Ig クラス別の濃度は IgG $1,662 \pm 1,326$, IgA 372 ± 177 , IgM 648 ± 526 ng/ml であった。これに対し PWM 添加の条件下では、338～7,900 ng/ml の Ig 産生が認められ、各 Ig クラス別では IgG は $3,855 \pm 2,542$, IgA は 998 ± 632 そして IgM は $3,620 \pm 2,673$ ng/ml であった。各 Ig クラスの κ/λ 比は、IgG で 1.6 ± 0.39 , IgA で 0.53 ± 0.05 , IgM 1.6 ± 0.41 であった。

一方、骨髄腫患者 (図3) では、PWM 非添加の条件

図2 正常人の末梢血リンパ球のIg産生

下でも, IgG (κ) 骨髄腫で IgG 888~4,850 ng/ml, κ/λ 比 5.6~59.7, また IgG (λ) 骨髄腫では IgG 9,500 ng/ml, κ/λ 比 0.23, さらに IgA (κ) 骨髄腫の IgA 13,800 ng/ml, κ/λ 比 5.8, そして IgA (λ) 骨髄腫の IgA 2,550 ng/ml, κ/λ 比 0.03 であり, それぞれの血中のM成分に相当するクラスとタイプの Ig が多く産生され, IgG 骨髄腫では正常人の IgG 産生量との間に統計学的に有意の差を認めた ($p < 0.05$). ただし, その産生量は症例に

よりかなりの差が認められた. しかし, residual Ig に相当するクラスの産生 Ig 量は 60~2,750 ng/ml と, 正常人より低値であった. さらに PWM 添加の条件下では, case 3~case 8 のごとくほとんどの症例では, M蛋白, residual Ig ともに産生 Ig 量の増加は認められず, 正常人の場合とは異なっていた. しかし, case 1, case 2 のごとく, IgG は 13,425 ($\kappa/\lambda = 2.8$), 12,000 ($\kappa/\lambda = 2.0$), IgA は 470, 3,625, また IgM は 60, 3,150 ng/ml と,

図3 骨髄腫患者の末梢血リンパ球のIg産生

case 1 では IgG の, case 2 では IgG, IgA, IgM の産生増加が認められ, その Ig 量の増加は主として residual Ig のクラスまたはタイプに相当する Ig の産生増加によるという例も少数存在した。

これに対し, マクログロブリン血症患者では (図4), PWM 添加, 非添加のいずれの条件下でも血清中の M 成分に相当する IgM が 5,600~14,000 ng/ml と大量に産生され, 正常人の IgM 産生量との間に有意の差が認められた ($p < 0.01$)。また, その κ/λ 比にも 5.7~ ∞ と著しい偏りが認められた。residual Ig に相当する IgG は 72~1,250, IgA は 45~400 ng/ml と少なく, PWM

添加および非添加の両者の間にほとんど差を認めなかった。

また, BMG 患者では (図5), PWM 非添加の条件下の産生 Ig 量は, M 成分に相当する IgG が 465~1,325 ng/ml, residual Ig に相当する IgA, IgM はそれぞれ 480~1,080, 60~750 ng/ml と正常人とほぼ同等であった。IgG の κ/λ 比は κ 型症例 1.2, λ 型症例 1.0, 1.6 と正常人の培養上清中の産生 IgG の κ/λ 比にほぼ等しい値であり, 骨髄腫患者とは異なっていた。PWM 添加の条件下でも, 産生 Ig 量は IgG 3,025~5,125, IgA 710~2,838, IgM 1,000~5,400 ng/ml と正常人とほぼ同

図4 マクログロブリン血症患者の末梢血リンパ球のIg産生

図5 BMG患者の末梢血リンパ球のIg産生

程度で、IgGの κ/λ 比も κ 型症例1.2, λ 型症例1.2, 1.3であった。

3. 末梢血B細胞の *in vitro* におけるIg産生に及ぼすT細胞の影響 (図6)

IgG (κ), IgG (λ) 骨髄腫の代表例各1例を示した。IgG (κ) 骨髄腫では、患者B細胞 (P.B) + 患者T細胞 (P.T) の組み合わせの場合、IgG 1,520 ng/ml ($\kappa/\lambda = 21.4$) と産生IgGのほとんどがM成分に相当するIgGであった。さらに、この患者T細胞を正常人T細胞に変更したP.B + 正常人T (N.T) の組み合わせでもIgG

1,600 ng/ml ($\kappa/\lambda = 16.5$) とIgGの産生量およびその κ/λ 比ともに変化はなく、骨髄腫患者B細胞のIg産生能はT細胞機能の変化による影響を受けなかった。

また正常人B細胞 (N.B) + N.TではIgG 4,200 ng/ml ($\kappa/\lambda = 2.1$) であるのに対し、N.B + P.TではIgG 2,100 ng/ml ($\kappa/\lambda = 2.5$) と、骨髄腫患者T細胞は正常人B細胞のIg産生量をやや減少させるが、 κ/λ 比には影響を及ぼさなかった。residual Igに相当するIgA, IgMについてもP.B + P.Tでそれぞれ280, 100 ng/ml, その κ/λ 比0.81, 1.3であり、P.B + N.Tで800, 120 ng/ml, その κ/λ 比1.0, 1.2であった。すなわち、P.TをN.T

図 6 B細胞のIg産生に及ぼすT細胞の影響

に変更してもIg産生量はやや増加したのみで、いずれも κ/λ 比は正常人リンパ球分画のものとほぼ同程度であった。また、N.B+P.TでもIg産生量はそれぞれ540, 150 ng/ml, κ/λ 比は0.41, 0.98であり、P.TはN.BのIg産生を抑制したがその κ/λ 比には影響を与えないという成績であった。またIgG(λ)骨髄腫でも同様の結果であった。

なお、T細胞分画のみの培養では、正常人、骨髄腫ともに、培養上清中のIg濃度は10 ng/ml以下で、Igの産生は認められなかった。

4. SmIg⁺細胞の比率と κ/λ 比

表1に末梢血リンパ球中のSmIg⁺細胞の比率とその κ/λ 比を示した。各症例のM成分のL鎖型に相当するSmIg⁺細胞が骨髄腫患者では軽度増加し、マクログロブリン血症患者では著しく増加していた。しかし、骨髄腫患者ではSmIg⁺細胞の比率およびその κ/λ 比と、*in vitro*におけるB細胞の産生Ig量およびその κ/λ 比との間には相関は認められなかった。

IV. 考 察

単クローン性 γ グロブリン血症における単クローン性B細胞クローンの広がりについての議論は主として骨髄

腫の末梢血B細胞について行われてきた。1967年に三好³⁾は、末梢血リンパ球分画の破碎抽出液と各種抗ヒトIg特異抗血清を用いたOuchterlony法により、1973年にLindströmら⁴⁾はM成分に対する抗idiotype抗体を用いた蛍光抗体法により、骨髄腫患者の末梢血リンパ球にも単クローン化がみられることを報告した。その後、今日まで種々の方法による報告があり、骨髄腫患者の末梢血B細胞の中に単クローン性B細胞が存在することは、多くの研究者により支持されている⁵⁻⁷⁾。しかし、一方では末梢血中にidiotype陽性SmIg⁺細胞は検出されないとする報告もあり^{8,9)}、方法論的な問題点も残されている。とくにHooverら¹⁰⁾は、血清中のM蛋白をFc receptorに結合したT細胞が骨髄腫の末梢血中に存在することを報告したが、この問題は蛍光抗体法やplaque forming cell(PFC)法を用いるかぎり解決は困難であると考えられる。したがって、われわれはidiotypeに比べより普遍的で、多数例による検討が可能な κ/λ 比を単クローン化のマーカーにして、末梢血B細胞の産生するIgの単クローン化および、その単クローン性B細胞の機能を検討した。

末梢血リンパ球の培養実験からは、PWM非添加の条件下で、正常人(図2)ではすでにIg産生にcommitされた少数のB細胞による少量のIg産生が認められた

のみであった。これに対し、骨髄腫患者（図3）では、末梢血リンパ球中にはM蛋白産生にcommitされた細胞クローンが比較的多数存在し、M蛋白に相当するIgを産生すると考えられた。

T細胞依存性の多クローン性B細胞刺激因子であるPWM添加の条件下では（図2）、正常人の産生Ig量は多クローン性に増加し、その κ/λ 比は三好ら¹¹⁾が報告した正常日本人の血清Igの κ/λ 比とほぼ一致した。さらに、経時的なIg産生動態をみると（図1）、正常リンパ球では2相性のIgの産生が認められた。Hammarströmら¹²⁾もPFC法により同様のIg産生動態を認め、それにはT細胞の存在が必要であることを報告している。すなわち、第2相における急激なIg産生には、helper T細胞を介した¹³⁾刺激がB細胞に伝えられるまでの、第1相に相当する時間が必要であると考えられる。これに対し、骨髄腫患者ではM蛋白の産生量は、PWM添加時もPWM非添加時とほぼ同等であり、経時的なIg産生動態でもT細胞依存性の2相性の産生はなく、直線的なM蛋白の産生増加がみられた。このことは骨髄腫患者末梢血B細胞のM蛋白の産生にはhelper T細胞の関与は必要でないことを示唆している。

また著者らは先に、正常人B細胞のIg産生は骨髄腫患者のT細胞により抑制され、その抑制は骨髄腫患者において増加しているLeu 2a⁺ Leu 7⁺細胞によることを報告した¹⁴⁾。しかし、正常人T細胞との混合培養の結果をみると、骨髄腫患者のB細胞によるM蛋白の産生量は、正常人T細胞の添加によっても増加せず、単クローン化したB細胞は、このような抑制性細胞の影響を受けないことが明らかとなった（図6）。すなわち、これらの単クローン化したB細胞の分化はT細胞を中心とした免疫調節機構に依存していないと考えられる。また、M蛋白のクラスに相当するIgの*in vitro*での産生量およびその κ/λ 比の偏りの程度と、末梢血中のSmIg⁺細胞数およびその κ/λ 比（表1）との間には必ずしも相関はなく、SmIg⁺細胞とは分化段階の異なるB細胞subsetが末梢血中に存在することも示唆された。これらB細胞は抗原非依存期のものである可能性や、もはやT細胞を必要としない分化段階のB細胞である可能性などが考えられる。いずれにしても、この単クローン化B細胞の起源やその分化過程は、今後さらに検討を要する問題である。

一方、Case 4のように、SmIg⁺細胞の κ/λ 比からは明らかな単クローン性B細胞の存在を同定できない場合でも、その*in vitro*における産生Igの κ/λ 比から（図3）単クローン化が同定できる場合もあり、産生Igの

κ/λ 比を定量することは、より感度の高いB細胞単クローン化の同定法と考えられる。

PWM添加によるresidual Igの産生増加量は症例によりその程度に差が認められたが、この差は末梢血中に存在する正常B細胞数と著者らがすでに報告したLeu 2a⁺ Leu 7⁺細胞によるIg産生抑制機能の程度の違いによるものと考えられた。さらにresidual Igの κ/λ 比も正常人のものと差がなかった。また、著者ら²⁾が報告したように、骨髄腫患者のT細胞には正常人B細胞のIg産生に対する多クローン性の抑制能は認められたが、L鎖型に特異的な抑制ではなかった。

マクログロブリン血症患者においては（図4）、PWM添加、非添加にかかわらず骨髄腫患者よりさらに大量のM蛋白の産生が認められ、マクログロブリン血症患者の末梢血中には骨髄腫に比べさらに多数の単クローン化したB細胞クローン、もしくは腫瘍細胞そのものが存在していると考えられた。このことは、マクログロブリン血症患者の末梢血中にSmIg⁺細胞が著しく増加しており（表1）、その κ/λ 比も骨髄腫に比べ著しく偏っていることから裏付けられる。

一方、BMG患者では（図5）、PWM添加、非添加のいずれの条件下でも、その症例のM蛋白に相当するIgの産生量および κ/λ 比は正常人のそれと同程度で、明らかなB細胞の単クローン化はこの方法では同定できなかった。しかし、BMG患者においてもidiotype陽性B細胞が同定できるというCarmagnolaら¹⁵⁾などのこれを支持するいくつかの報告もあり、末梢血中に存在する単クローン化したB細胞の絶対数が多クローン性B細胞よりもはるかに少ないためかもしれない。

以上、骨髄腫やマクログロブリン血症では形質細胞やリンパ球様細胞の単クローン性増殖に加え、末梢血B細胞の分化段階まで単クローン化が存在することを明らかにした。この単クローン化B細胞と腫瘍性に増殖した形質細胞との関連はまだ明らかではない。もしも腫瘍細胞クローンもpre-B細胞、mature B細胞と連続的に各分化段階を経て形質細胞に分化するという立場をとるならば、本論文で示した単クローン化B細胞のprecursor段階の細胞について検討が必要であるが、これに関連しては、Kubagawaら¹⁶⁾の抗idiotype抗体によりpre-B細胞まで単クローン化を認めたという報告があるのみである。したがって、細胞質内に μ 鎖のみを認めるpre-B細胞、さらにはIgを産生しないpre-pre-B細胞、そしてB幹細胞などの単クローン化の有無を明確にするためには、単クローン性Igのidiotypeをコードするgeneそのものをトレーサーとして検索する必要がある

と考えられる。

V. 結 語

単クローン性ガンマグロブリン血症において末梢血中に単クローン性B細胞クローンが存在するか否かを検索するために、*in vitro* における末梢血B細胞の産生Igについて検索した。骨髓腫では末梢血B細胞の分化

段階まで明らかに単クローン化が認められること、マクログロブリン血症では、著明な単クローン化の認められることを示した。また、これらのB細胞はT細胞などの免疫調節細胞による影響を受けることなくM蛋白分泌細胞に分化しうることを明らかにした。

謝辞：稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った徳島大学第一内科斎藤史郎教授に深謝します。

文 献

- 1) 三好和夫・小阪昌明・沼田幸子・他1名：B cell malignancy-その臨床と病理。臨床血液，21：1496～1503，1980。
- 2) 岡川和人・井口敬一・井石安比古・他1名：骨髓腫，マクログロブリン血症および良性M蛋白血症におけるT細胞サブセット：モノクローナル抗体による表面形質の検索とB細胞のIg産生能に及ぼす効果の検討。日血会誌，48：1205～1213，1985。
- 3) 三好和夫：異常蛋白血症（1967年4月内科学会宿題報告）。日内会誌，57：180～199，1968。
- 4) Lindström, F.D., Hardy, W.R., Eberle, B.J., et al.: Multiple myeloma and benign monoclonal gammopathy: Differentiation by immunofluorescence of lymphocytes. Ann. Intern. Med., 78: 837～844, 1973.
- 5) 小阪昌明：人骨髓腫リンパ球の保有免疫グロブリンならびに表面免疫グロブリンの単クローン化。四国医誌，31：60～75，1975。
- 6) Dammacco, F., Vacca, A., Altomare, E., et al.: Immunoglobulin secretion by peripheral blood and bone marrow B cells in patients with multiple myeloma. Studies by the reverse haemolytic plaque assay. Clin. exp. Immunol., 57: 743～751, 1984.
- 7) Peest, D., Holm, G., Mellstedt, H., et al.: in vitro production of monoclonal and polyclonal immunoglobulins by peripheral blood mononuclear cells in human plasma cell myeloma. Scand. J. Immunol., 15: 595～603, 1982.
- 8) King, M.A., Vivianwells, J.: Cell-bound immunoglobulin on peripheral blood mononuclear cells of patients with myeloma. Clin. exp. Immunol., 45: 552～556, 1981.
- 9) Pilarski, L.M., Mant M.J., Ruether, B.A., et al.: Severe deficiency of B lymphocytes in peripheral blood from multiple myeloma patients. J. Clin. Invest., 74: 1301～1306, 1984.
- 10) Hoover, R.G., Hickman, S., Gebel, H.M., et al.: Expansion of Fc receptor-bearing T lymphocytes in patients with immunoglobulin G and immunoglobulin A myeloma. J. Clin. Invest., 67: 308～311, 1981.
- 11) 三好和夫・沼田幸子・渋谷和彦・他3名：骨髓腫とマクログロブリン血症 —診療に有用な数値表— 日本臨床，32：1848～1856，1974。
- 12) Hammarström, L., Bird, A.G., Britton, S., et al.: Pokeweed mitogen induced differentiation of human B cells: evaluation by a protein A haemolytic plaque assay. Immunology, 38: 181～189, 1979.
- 13) Yachie, A., Miyawaki, T., Yokoi, T., et al.: Ia-positive cells generated by PWM-stimulation within OKT 4⁺ subset interact with OKT 8⁺ cells for inducing active suppression on B cell differentiation *in vitro*. J. Immunol., 129: 103～106, 1982.
- 14) 小阪昌明・斎藤芳国・井石安比古・他6名：骨髓腫患者末梢血におけるLeu 7⁺細胞サブポピュレーションの解析。日本臨床免疫学会誌，8：168～171，1985。
- 15) Carmagnola, A., Boccadoro, M., Massaia, M., et al.: The idiotypic specificities of lymphocytes in human monoclonal gammopathies: analysis with the fluorescence activated cell sorter. Clin. exp. Immunol., 51: 173～177, 1983.
- 16) Kubagawa, H., Vogler, L.B., Capra, J.D., et al.: Studies on the clonal origin of multiple myeloma. J. Exp. Med., 150: 792～807, 1979.