

In vitro の免疫グロブリン産生におよぼす免疫グロブリン製剤の影響について

崎 山 幸 雄
橋 本 文 久
松 本 脩 三
(北海道大学医学部小児科)

はじめに

免疫グロブリン製剤は原発性免疫不全症における置換療法，重症感染症における補助療法としてひろく使用されており，それらはいずれも抗体の受動免疫による感染の治療，予防を目的としたものである。近年，数種類のいわゆる intact タイプの静注用免疫グロブリン製剤が開発され，大量投与が可能になり，血中濃度の急速な上昇と長期にわたる維持が期待できるようになった。そのため投与量の増加のみならず 2，3 の非感染性疾患にも適応されるケースが散見され，その適応がいくぶん過大視される面がなきにしもあらずである。これら非感染性疾患における投与は免疫グロブリン製剤の抗体としての作用とは別にそのイディオタイプ，あるいは Fc リセプターを介した免疫担当細胞との関連から免疫反応に何らかの影響を与える可能性を期待して行われているものと推測される。いずれにしても大量の IgG を投与してその血中濃度を一定レベル以上に上げる場合には in vivo でいろいろな現象が起きうる可能性があり，少なくとも in vitro でなしうる検討は行っておく必要があると考える。そのような点のひとつとして今回，われわれは筋注用免疫グロブリンおよび 3 種類の静注用免疫グロブリン製剤を各種の濃度においた場合にそれらが in vitro における PWM, Epstein-Barr virus (EBV) 刺激による末梢血リンパ球の免疫グロブリン産生にいかなる影響をおよぼすかについて検討を加えた。

方 法

1) 免疫グロブリン産生能の評価

ヒト末梢血より Ficoll-Conray 比重遠沈法により分離した単核細胞 ($5 \times 10^5/ml$) を 10% 胎児ウシ血清 (FCS) 加 RPMI 1640 で調整し，PWM (Grand Island Biol. Co. NY) を $10 \mu l$ 添加，5% CO_2 ， $37^\circ C$ ，6 日間培養後，2,000 rpm，10 分間遠沈，その後，培養液を 10% 透析 FCS 加ロイシン不含 MEM と交換，同時に 3H -leucine でパルス，24 時間後に 2,000 rpm，20 分間遠沈し上清を得た。上清は透析後 $-20^\circ C$ に保存した。上清中の免疫グロブリン濃度は直径

6.4 mm の polystyrene ball (PS-ball) を用い、炭酸緩衝液 (pH 8.4) で $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調整したヤギ抗ヒト IgG, IgA, IgM を 4°C 、24時間作用させた。この Ig 吸着 PS-ball に $100 \mu\text{l}$ の培養上清、および同量の10% BSA 加 PBS を加え、 37°C 、1時間静置、生食で PS-ball を2度洗浄し、液体シンチレーションカウンターによりその放射活性を測定した。

2) 使用した各免疫グロブリン製剤と、PWM 刺激による免疫グロブリン産生能におよぼすその影響について

実験に用いた製剤は i) pepsin degradation, ii) S-sulfonation, iii) PEG treatment, iv) cold ethanol fraction (ISG) によるものおよび v) 単離 IgG, vi) 単離 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 分画である。各製剤を $0.01 \text{ mg}/\text{ml}$, $0.05 \text{ mg}/\text{ml}$, $0.1 \text{ mg}/\text{ml}$, $0.5 \text{ mg}/\text{ml}$, $1 \text{ mg}/\text{ml}$ の濃度でヒト末梢血単核細胞に添加し、PWM 刺激による免疫グロブリン産生におよぼす影響について検討した。

3) 標的細胞の解析

単核細胞を2度にわたり0.5% neuraminidase 処理 SRBC を用いたロゼット形成法により、非ロゼット細胞 (B細胞), ロゼット形成細胞 (T細胞) に分離し、B, T細胞のおおのを $1 \text{ mg}/\text{ml}$ の免疫グロブリン製剤と 37°C 、1時間 preincubation し、以下のように組合せた。i) B細胞(免疫グロブリン処理)+T細胞, ii) B細胞+T細胞 (免疫グロブリン処理), iii) B細胞 (免疫グロブリン処理)+T細胞 (免疫グロブリン処理), iv) B細胞+T細胞, v) 単核細胞+T細胞 (免疫グロブリン処理)。

4) EBV 刺激による免疫グロブリン産生系におよぼす影響について

単核細胞を EBV (B95-8 細胞の培養上清) により 37°C 、1時間刺激、洗浄後、免疫グロブリン製剤と co-culture し、その影響を分析した。

結 果

PWM 刺激によるヒト末梢血リンパ球反応に対し ISG では抑制率は dose dependent であり、 $0.01 \text{ mg}/\text{ml}$ まで有意の産生抑制を認めた (危険率0.01以下)。S-スルホ化、PEG 処理の製剤では $0.05 \text{ mg}/\text{ml}$ まで有意の抑制を認め、この S-スルホ化、PEG 処理の2製剤と ISG の抑制率には有意の差を認めた。しかし S-スルホ化と PEG 処理製剤の間には有意の差を認めなかった。ペプシン処理製剤では抑制は認められなかった (図1)。IgA, M 産生系ではいずれも ISG は $0.01 \text{ mg}/\text{ml}$ の濃度まで、S-スルホ化、PEG 処理では $1 \text{ mg}/\text{ml}$ のみに有意の抑制が認められ、ペプシン処理製剤では抑制は認められなかった (図2, 3)。

次に purified human IgG $\text{F}(\text{ab}')_2$ 分画 (Cappel Lab., Inc.) と purified human IgG が およぼす影響について検討した。それぞれを $1 \text{ mg}/\text{ml}$ となるように培養系に添加したところ、IgG $\text{F}(\text{ab}')_2$ では抑制は認めなかったが、whole molecule IgG では全ての Ig クラスに有意の抑制が認められた (図4)。

標的細胞の分析ではB細胞のみを preincubation した場合にも T細胞のみを preincubation した場合にもともに免疫グロブリン産生は有意に抑制された (図5)。単核細胞に preincuba-

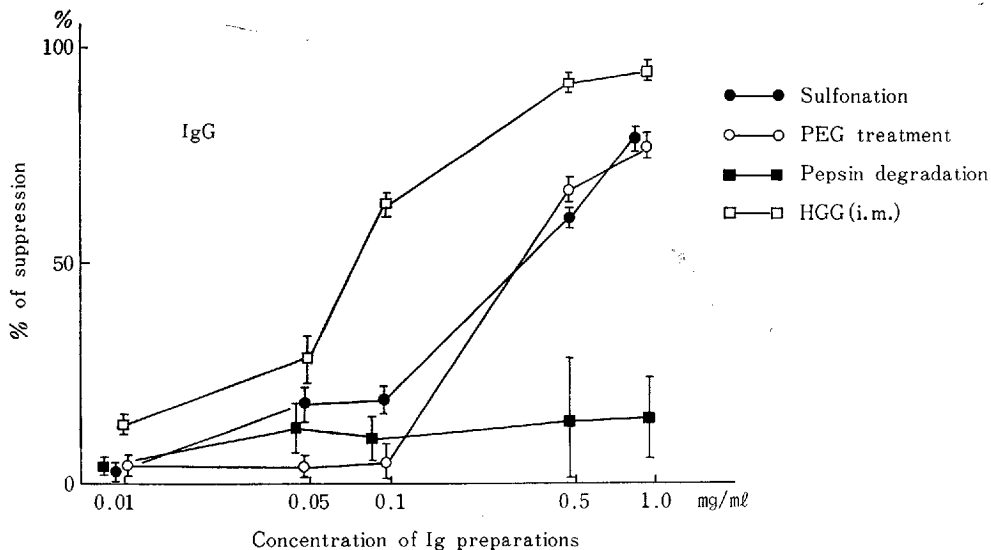


図1 Suppressive effect of Ig preparations on PWM induced Ig production

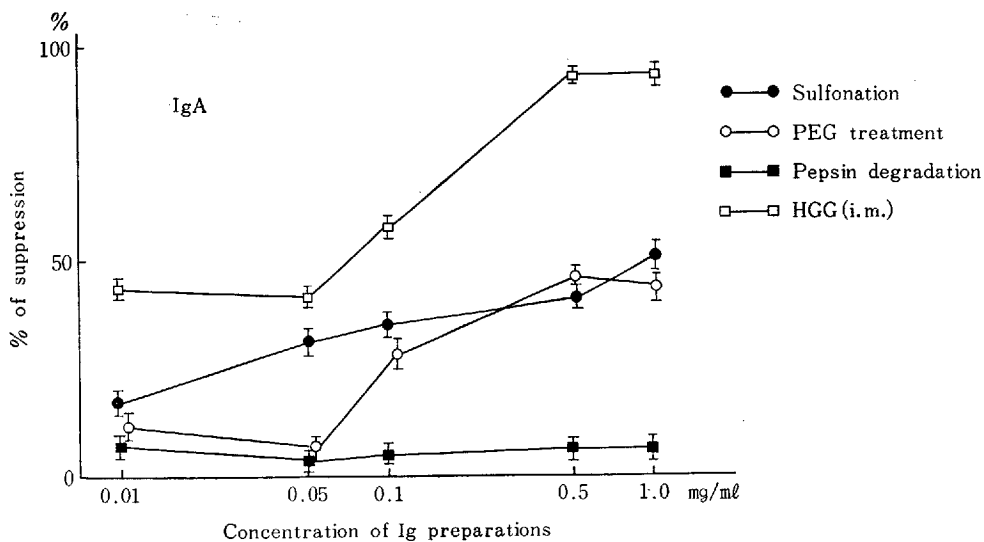


図2 Suppressive effect of Ig preparations on PWM induced Ig production

tion したT細胞を添加培養したシステムでは、未処理T細胞の添加培養では全く抑制の認められない、単核細胞：T細胞の10/1, 10/2, 10/4の各比率においても強い抑制効果が認められた(図6)。EBVで単核細胞を刺激し、その後ISGとco-cultureした場合にも0.1 mg/mlの濃度までIgG産生は抑制された(図7)。

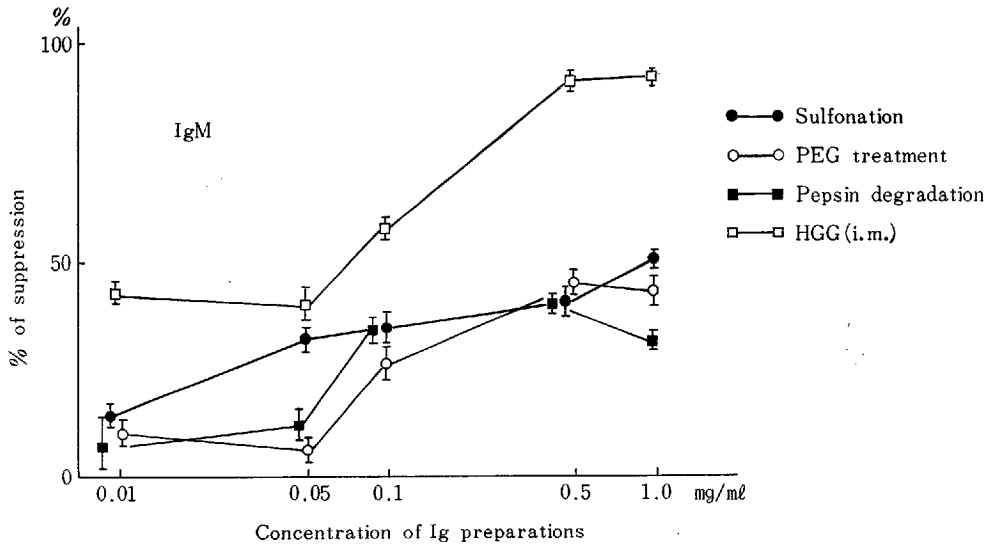


図3 Suppressive effect of Ig preparations on PWM induced Ig production

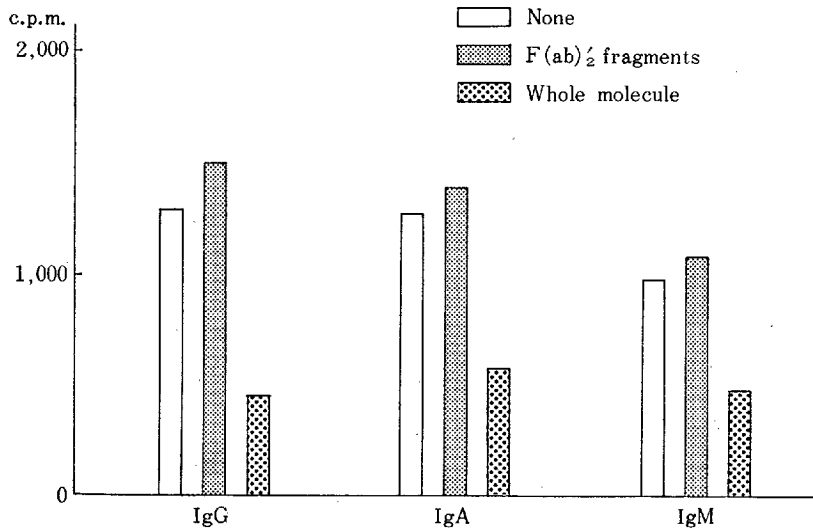


図4 Suppression of PWM-induced Ig production by whole molecule and F (ab)₂ fragments

考 按

受動的に与えられた抗体が特異的に抗体産生に主として抑制的に作用することは古くから知られており、Rho(D) 陰性の母の出産時に抗D特異抗体を含むγグロブリンの投与により出産後の母体の感作を防止できるのは、この現象の応用である。この抗体による抗体産生の特異的抑制の機序については一つには多量の特異抗体を使用した時に認められる抗原決定基のmaskingであり、いま一つには少量の抗体による免疫担当細胞間の協調作業の阻害によると

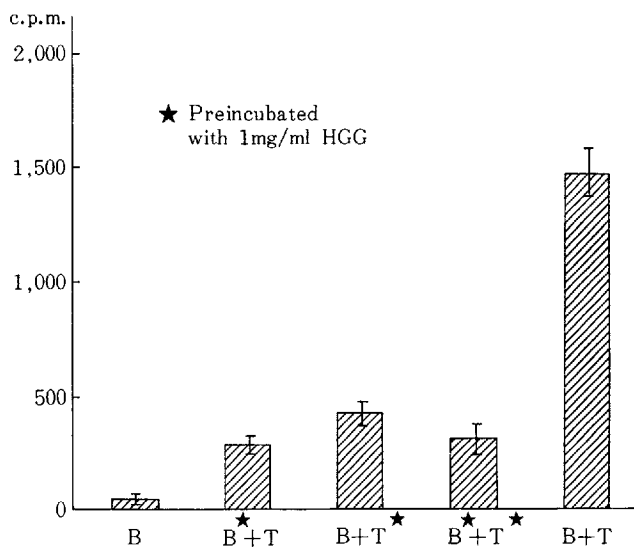


図5 Suppression of Ig production by T and B cells preincubated with HGG

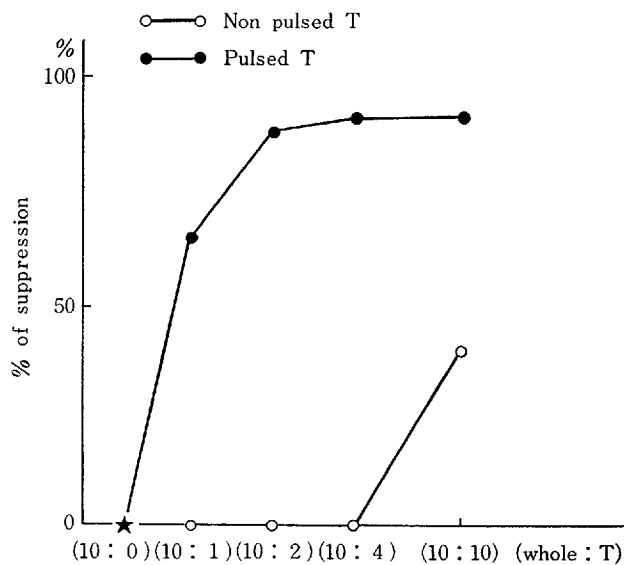


図6 The suppressive effect of HGG pulsed T cells

考えられている。これには抗体の Fc リセプターを介した抑制作用、抗体によるイデオタイプ、抗イデオタイプの干渉などが推測されている¹⁾。また Sinclair らはマウスを用いた実験において抗 SRBC 抗体産生は whole antibody あるいは IgFc 分画では抑制されるが F(ab')₂ 分画ではその抑制が著しく弱くなることを見出している。

一方特異抗体による抗体抑制とは別に低ガンマグロブリン血症の患者に γ -グロブリン製剤を投与した際にサプレッサー T 細胞の機能亢進が認められたとする報告がある³⁾。また筋注用

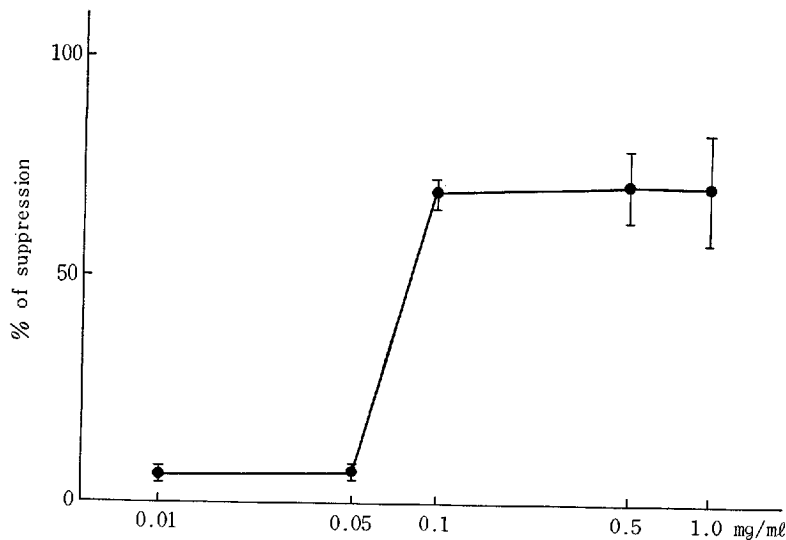


図7 Suppressive effect of Ig preparations on EBV induced Ig production (IgG)

γ -グロブリン製剤を10名の免疫不全を伴わない上気道感染症の症例に3~4回の投与後, *in vitro* での PWM による免疫グロブリン産生細胞数が減少することを見出した報告もある⁴⁾。

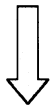
今回, われわれの結果では *in vitro* で ISG, S-スルホ化, PEG 処理の各 γ -グロブリン製剤を PWM による免疫グロブリン産生系に添加培養すると, 免疫グロブリン産生が著しく抑制されることが見出された。ペプシン処理製剤ではこの抑制効果は認められず, IgG の F(ab')₂ でも同様に認められないことから, IgG Fc 分画の関与が示唆された。また ISG と PEG 処理, S-スルホ化との間に抑制効果の差が認められたことより, aggregates を形成していることがこの現象に重要な関与を有するものと考えられた。しかしこれらの製剤を62°C, 20分間熱処理し, 未処理の各製剤と比較検討したが, 抗補体活性は著明に増強するが, 免疫グロブリン産生における抑制効果に有意の変動は認められなかった。このことから aggregates は抑制作用に関与していても抗補体活性とは平行しないことが明らかになった。また各製剤に含まれる aggregates の含有率はペプシン処理では4%, S-スルホ化15%, PEG 処理4%, ISG 29%と ISG において著しく高いものの S-スルホ化と PEG 処理製剤に認められる差は実際上は免疫グロブリン産生における抑制効果に反映される程度のもではなかった。これらのことから aggregates はまた, 少なくとも dose dependent に抑制効果に作用するものでもないことが示された。

preincubation のシステムではB細胞, T細胞のいずれか一方のみを培養しても抑制が認められたことから, T, B細胞それぞれに抑制経路が存在することが示唆された。T細胞のみを免疫グロブリン製剤と preincubation し, その後単核細胞に添加するシステムではサプレッサーT細胞が活性化されていることが示された。また EBV で培養後に免疫グロブリン製剤と co-culture した系では PWM 以外のB細胞刺激による系においても抑制効果が認められるこ

とが示された。

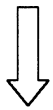
文 献

- 1) 崎山幸雄 : γ -グロブリン. 臨床医, **7** : 2444, 1981.
- 2) Sinclair, N.R. : Regulation of the immune response. J. Immunol., **113** : 1493, 1974.
- 3) Siegal, F.P. : Suppression of B cell differentiation by leukocytes from hypogammaglobulinemia patients. J. Clin. Invest., **58** : 109, 1976.
- 4) Durandy, A. : Dysfunction of pokeweed mitogen-stimulated T and B lymphocyte responses induced by gammaglobulin therapy. J. Clin. Invest., **67** : 867, 1981.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



はじめに

免疫グロブリン製剤は原発性免疫不全症における置換療法,重症感染症における補助療法としてひろく使用されており,それらはいずれも抗体の受動免疫による感染の治療,予防を目的としたものである。近年,数種類のいわゆる intact タイプの静注用免疫グロブリン製剤が開発され,大量投与が可能になり,血中濃度の急速な上昇と長期にわたる維持が期待できるようになった。そのため投与量の増加のみならず,2,3の非感染性疾患にも適応されるケースが散見され,その適応がいくぶん過大視される面がなきにしもあらずである。これら非感染性疾患における投与は免疫グロブリン製剤の抗体としての作用とは別にそのイデオタイプ,あるいはFcリセプターを介した免疫担当細胞との関連から免疫反応に何らかの影響を与える可能性を期待して行われているものと推測される。いずれにしても大量のIgGを投与してその血中濃度を一定レベル以上に上げる場合には in vivo でいろいろな現象が起きうる可能性があり,少なくとも in vitro でなしうる検討は行っておく必要があると考える。そのような点のひとつとして今回,われわれは筋注用免疫グロブリンおよび3種類の静注用免疫グロブリン製剤を各種の濃度においた場合にそれらが in vitro におけるPWM, Epstein-Barr virus(EBV)刺激による末梢血リンパ球の免疫グロブリン産生にいかなる影響をおよぼすかについて検討を加えた。