

慢性関節リウマチ患者末梢血および滑液単核細胞の 免疫グロブリン, IgM リウマトイド因子および インターロイキン 2 産生能に関する研究

国立療養所村山病院内科

野 口 修

(昭和61年10月24日受付)

Key Word: rheumatoid arthritis, aggregated IgG, immunoglobulin, rheumatoid factor, interleukin 2.

慢性関節リウマチ (RA) では高 γ -グロブリン血症と IgG に対する自己抗体であるリウマトイド因子 (RF) が高率に認められ, その病因に免疫異常の関与が強く示唆される^{1,2)}。これまで, RA における免疫異常の解析法の一つとして末梢血³⁻⁸⁾ さらに滑液 (膜) リンパ球^{3,6,8-13)}を用いて免疫グロブリン (Ig) あるいは RF 産生能が検討されてきたが, 必ずしも一定の成績が得られていない。

そこで, RA における免疫機構の異常を解析するため, 末梢血および滑液中より同時に採取した患者単核細胞の無刺激, pokeweed mitogen (PWM) 刺激, 熱変性ヒト IgG (agg. IgG) 刺激による *in vitro* での Ig 産生能と IgM RF 産生能を測定し, それぞれを比較検討した。さらに T細胞機能の指標として phytohemagglutinin (PHA) 刺激による interleukin-2 (IL-2) 産生能を RA 患者と正常人とで測定し比較をした。以上の成績を *in vivo* の免疫異常の一つの指標である RF の値により層別化し検討した。

対象ならびに方法

1. 対象

国立療養所村山病院内科, 整形外科および防衛医科大

Analysis of immunoglobulin, IgM rheumatoid factor, and interleukin-2 production by peripheral blood and synovial fluid mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis.

Osamu Noguchi, M.D.

Department of Internal Medicine, Murayama Byoin National Sanatorium

学第一内科, 整形外科に通院または入院中のアメリカリウマチ協会の RA 診断基準¹⁴⁾で classical および definite の RA 30例 (男6例, 女24例) を対象とした。対象を血清 RF の値で高力価群と低力価群の2群に層別化した (第1表)。すなわち, 単核細胞採取時の血清 RF が RA テスト (ラテックス凝集反応, 栄研化学) で (2+) あるいは RAHA (感作血球凝集反応, 富士レビオ) で 2560倍 \leq の16例を RF 高力価群とし, それ以外の14例を

第1表 対象 RA 患者の臨床的背景

	リウマトイド因子	
	高力価群 (RAテスト(2+)または RAHA \geq 2560X)	低力価群 (RAテスト(1+)~(-)または RAHA \leq 1280X)
症例数	16	14
性:男/女	2/14	4/10
年齢分布(歳)	43~79	26~72
平均罹病期間(年)	9.8	10.2
Stage		
I	1	1
II	5	4
III	4	4
IV	6	5
平均関節点数	52	47
治療薬		
NSAIDのみ	5	6
NSAID+ステロイド	4	3
NSAID+金塩	4	2
NSAID+ステロイド +金塩	3	3
D-PC	0	0
免疫抑制剤	0	0

NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drug
D-PC: D-penicillamine

低力価群とした。単核細胞採取時の RF 陰性例は前後の経過を調べると一時期陽性を示しており、全経過を通じ RF が陰性であった seronegative RA は含まれていなかった。そこで、これらはまとめて低力価群に分類した。

第1表に示す如く両群の男女比、年齢分布、罹病期間、stage、関節点数、治療薬の種類に有意の差はなかった。ステロイド剤の量は両群ともにプロドニソロン換算量で 2.5~10 mg で差がなかった。したがって、両群の臨床的背景はほぼ等しいと考えられた。対照群として7名の変形性膝関節症(OA)(全例女性、年齢36~76歳)と病院従業者5名の正常人(全例女性、年齢43~74歳)を用いた。IL-2産生能に関しては13名のRA(前記対象群と10名が重複)を18名の正常人(男4名、女14名、年齢24~65歳)を対照として検討した。

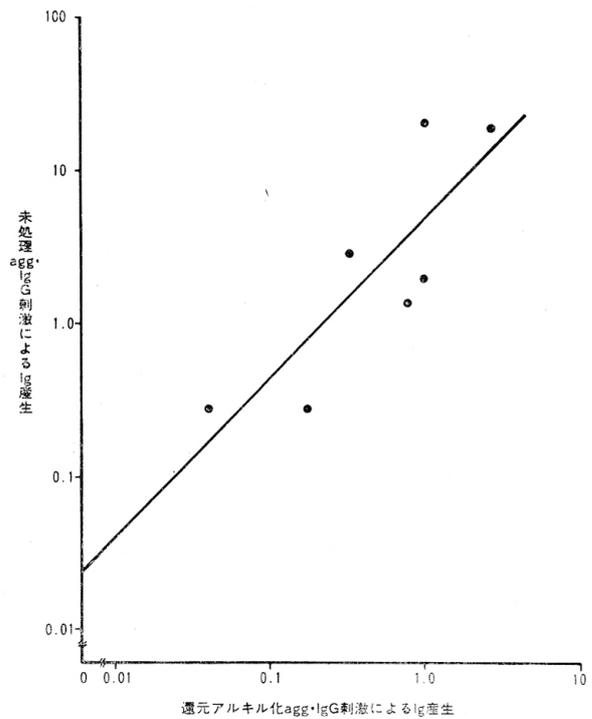
2. 末梢血および滑液単核細胞の分離

末梢血：ヘパリン加末梢血 20~30 ml を RPMI-1640 (Gibco 社, USA) 培養液(重曹 $2.4 \times 10^{-2} M$, 塩酸 $4 \times 10^{-3} M$, ペニシリン 100 units/ml, ストレプトマイシン 100 $\mu g/ml$ 添加)で3倍に希釈し、Böyumの方法¹⁵⁾に準じ1/2量のFicoll-Conray液に重層し1,550 rpmにて30分遠沈後、単核細胞を分離した。

滑液：ヘパリンの存在下に採取した滑液は RPMI-1640液を加え3倍に希釈し、ヒアルロニダーゼ(Sigma社, USA) 5 units/ml を添加、室温にて5分間反応させた。その後、同様にFicoll-Conray比重遠沈法で単核細胞を分離した。

3. 熱変性ヒト IgG (agg. IgG)

ヒト IgG (Miles 社, Elkart, USA) を滅菌蒸留水で 10 mg/ml とし、63℃ 20分間加熱後急冷し、培地にて最終濃度 400 $\mu g/ml$ とし 4℃ で保存、実験に供した。また、ヒト IgG の Fc レセプターを介する非特異的反応を防止する意味で、Zvaifler らの方法¹⁶⁾に準じて還元アルキル化 agg. IgG を作製した。すなわち、リン酸緩衝食塩水 (PBS, pH 7.3, 0.15 M) で溶解したヒト IgG 10 mg/ml に2-メルカプトエタノールを最終濃度 0.1 M となるように添加し室温で3時間反応させた。大量の 0.02 M ヨードアセタミド溶液にて 4℃ で4時間、その後 PBS にて overnight で透析した。これを 63℃ 20分間加熱後急冷し還元アルキル化 agg. IgG を得た。この還元アルキル化 agg. IgG 刺激による免疫グロブリン (Ig) 産生と還元アルキル化の操作を加えない agg. IgG を用いた抗原刺激 Ig 産生を7例の症例について検討し



第1図 未処理 agg. IgG と還元アルキル化 agg. IgG の比較

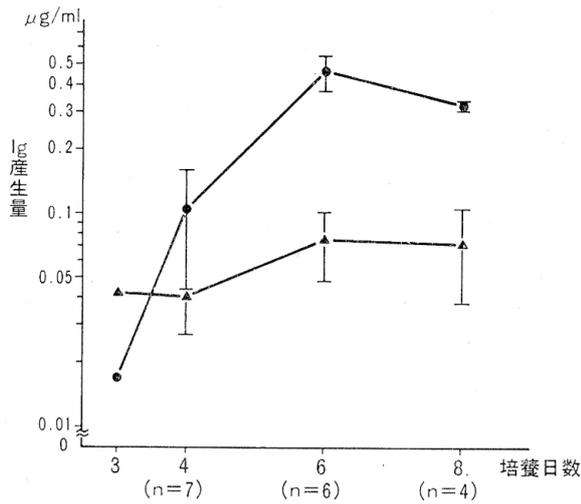
未処理 agg. IgG と還元アルキル化 agg. IgG 刺激による Ig 産生を7例のRA末梢血単核細胞において同時に測定し、刺激指数で表わし比較した。両者の間には $\log Y = 0.68 + 1.04X$, $r = 0.83$, $p = 0.02$ の有意の相関がみられた。

た。第1図に示すように両者は有意の正相関を示した。したがって、その後の実験はすべて還元アルキル化を行わず熱変性だけの agg. IgG を用いて行った。

4. 単核細胞培養

単核細胞を10%ウシ胎児血清 (FCS, Gibco 社, USA) と $5 \times 10^{-5} M$ 2-メルカプトエタノールを加えた RPMI 培地で $1 \times 10^6/ml$ に調製した。これを無刺激または 20 $\mu g/ml$ の PWM あるいは 10 $\mu g/ml$ の agg. IgG を添加してガラス試験管(直径 15 mm×長さ 100 mm)内で、37℃, 5% CO₂ 下で5日間培養した。RPMI-1640 培養液で3回洗浄し、PWM または agg. IgG を除去後、10% FCS 加培地 1 ml に再浮遊し24時間培養後の上澄を回収し、Ig または IgMRF の測定まで -20℃ で保存した。

なお、agg. IgG の濃度は 5, 10, 20, 40 $\mu g/ml$ の各濃度で検討した基礎実験で最大の Ig 産生量を示した上記 10 $\mu g/ml$ を至適濃度として採用した。また、培養期間も 3~8 日間の検討で Ig 産生量の頂値を示した 6 日



第2図 至適培養日数の検討

RA 末梢血単核細胞 ($1 \times 10^6/ml$) を PWM $20 \mu g/ml$ (●-●) および agg. IgG $10 \mu g/ml$ (▲-▲) の存在下に培養し、各培養日数のさいごの24時間における培養上澄中 Ig 産生量を測定した。(mean \pm SE)

間を至適培養期間とした(第2図)。

5. 培養上澄中の Ig の測定

培養上澄中に新生された Ig の測定はペルオキシダーゼ標識抗ヒト Ig による固相酵素抗体法によった (Solid phase EIA, 感度 $0.001 \mu g/ml$)。すなわち、50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で $1 \mu g/ml$ に希釈した抗ヒト Ig ヤギ血清 (Hyland 社, USA) を96穴平底マイクロプレート (Immunoplate, Nunc 社, Denmark) に $100 \mu l$ ずつ注ぎ、 $37^\circ C$ 2時間あるいは $4^\circ C$ overnight で反応させ固相抗体とした。使用時に 0.05% Tween 20 (和光純薬) 加 PBS (pH 7.4) (PBS-Tween) で3回洗浄した。同一検体を $100 \mu l$ ずつ3穴に入れ室温にて2時間反応させた。PBS-Tween にて3回洗浄後、PBS-Tween で4,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト Ig (抗 IgG, A, M および H, L 鎖特異的, Cappel 社, USA) を $100 \mu l$ ずつ加え $37^\circ C$ で2時間反応させた。最後に、PBS-Tween で3回洗浄後 OPD 試薬 (0-フェニレンジアミン 20 mg, 30% H_2O_2 $20 \mu l$, 0.1 M クエン酸緩衝液 [pH 4.8] $100 ml$) $200 \mu l$ を加え、室温で15分間遮光下に反応させた。2.5 M 硫酸 $50 \mu l$ を加え反応を停止させ、Microelisa® minireader MR 590 (Dynatech 社, USA) を用いて 492 nm にて吸光度を測定した。Cohn Fraction II (Sigma 社, USA) は培養上清の Ig 組成とは多少異なるが、便宜的にこれを標準ヒト Ig とした。すなわち、この希釈系列により用量-反応曲線を作

成し、各吸光度に対応する Ig 量を求めた。刺激指数 (Stimulation Index: SI) の算出は次式によった。

$$SI = \frac{\text{マイトゲンまたは抗原刺激 Ig 産生量}}{\text{無刺激時 Ig 産生量}}$$

6. IgM RF の測定

ウサギ IgG (Cappel 社, Cochranville, Pa, USA) を $10 \mu g/ml$ の濃度に 50 mM 炭酸緩衝液で溶解し、その $50 \mu l$ ずつを96穴平底マイクロプレートに注ぎ、 $37^\circ C$ overnight で反応させ固相抗原とした。

PBS-Tween で3回洗浄後検体の $50 \mu l$ を添加し、室温で2時間または $4^\circ C$ overnight で反応させた。さらに、PBS-Tween で洗浄後4000倍希釈のペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgM F(ab')₂ 抗体 (μ 鎖特異的) (Cappel 社, Cochranville, Pa, USA) を第2抗体として加え、室温で2時間反応させた。PBS-Tween で洗浄後、5. で記した如く、OPD 試薬で発色させ吸光度を測った。RF の検出限界は培地のみを反応させたマイクロプレートの吸光度をとった。

7. Tリンパ球の分離

FCS にて $5 \times 10^6/ml$ に調製した単核細胞に 0.5 v/v% 羊赤血球 (SRBC) を等量加え、 $37^\circ C$ 15分間反応させた。1000 rpm 5分間遠沈後水中に1時間静置しロゼット形成 (E-ロゼット) を行なった。2倍量の RPMI-1640 を加え Ficoll-Conray 比重遠沈法で E-ロゼット形成細胞を集め、トリスアンモニウムクロライド溶液 (0.17 M トリス 1 容, 0.16 M 塩化アンモニウム 9 容, pH 7.2) にて SRBC を溶血し T細胞分画とした。この分画に含まれる細胞の95%以上の細胞が E-ロゼット形成能を有していた。

8. IL-2 産生

T細胞を1% FCS, 0.5% HEPES 緩衝液 (pH 7.3) 加 RPMI-1640 培養液で $2.5 \times 10^6/ml$ に調製し、1% phytohemagglutinin-M (PHA-M) とともに24時間培養した。培養上澄中の PHA-M を1/10量のニワトリ赤血球で30分2回吸収し除去したものを IL-2 測定の検体とした。

9. IL-2 活性の測定

健常人 T細胞 $1 \times 10^6/ml$ を 50% IL-2, 1% PHA-M の存在下に培養し、4日毎に培地を半量ずつ交換し、17日以上維持したものを IL-2 dependent cell line とし

た。これを20% FCS, 1% Hepes 加 RPMI-1640 培養液で $1 \times 10^6/ml$ に調製し, $100 \mu l$ ずつ96穴のU底マイクロプレート (Dynatech 社, Virginia, USA) に加え, 反応細胞とした。IL-2 の検体 $100 \mu l$ ずつを各3穴に加え2日間培養後, $20 \mu Ci/ml$ の 3H -thymidine $20 \mu l$ (specific activity $2.0 Ci/m mol$) を添加, 24時間後, automatic cell harvester (Titertek, USA) にて回収し, 取り込まれた 3H -thymidine を液体シンチレーションカウンターで測定した。

10. 統計処理

群間の有意差検定は Mann-Whitney U test または t 検定 (Welch の方法) により両側検定を原則とした。

結 果

1. 末梢血単核細胞の Ig 産生 (第2表)

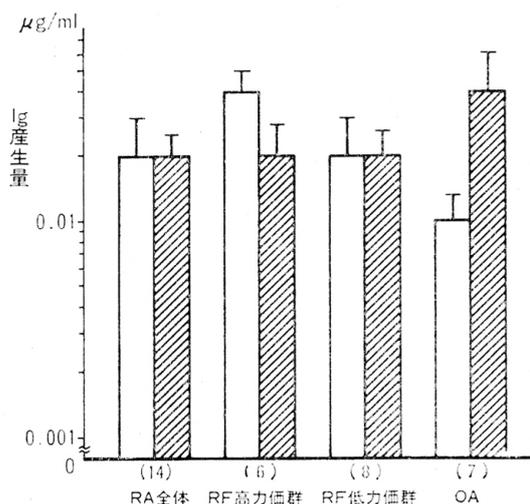
末梢血単核細胞の無刺激時の Ig 産生量は RA 全体では $0.14 \pm 0.06 \mu g/ml$ であった。これを RF 値で分けた2群で見ると, RF 高力価群は $0.05 \pm 0.02 \mu g/ml$ であり, RF 低力価群の $0.24 \pm 0.12 \mu g/ml$ に比べ低値の傾向を示し ($p < 0.1$), むしろ OA, 正常人に近い値であった。

PWM 刺激による Ig 産生量は RA 全体では $16.3 \pm 7.74 \mu g/ml$ であった。RF 高力価群は $1.67 \pm 0.62 \mu g/ml$ と RF 低力価群の $32.0 \pm 15.0 \mu g/ml$, さらに OA 群の $10.2 \pm 5.60 \mu g/ml$ に比べ有意に低値を示した ($p < 0.05$)。無刺激時の Ig 産生量に差があるので刺激指数でみたが同様で, RF 高力価群の刺激指数は 74.9 ± 45.0

と RF 低力価群より低く, とくに OA 群に比べ有意に低値を示した。

2. 滑液単核細胞の Ig 産生

滑液単核細胞の無刺激 Ig 産生量は第3図に示す様に RA 全体では $0.02 \pm 0.01 \mu g/ml$ であった。RF 高力価群は $0.04 \pm 0.01 \mu g/ml$ で RF 低力価群と比べ差はなく, また対照 OA 群の $0.01 \pm 0.003 \mu g/ml$ より高い値を示したが有意差はなかった。



第3図 RA および OA 滑液単核細胞の無刺激 (□) および PWM 刺激 (■) による Ig 産生量 RA および OA の滑液単核細胞 ($1 \times 10^6/ml$) を無刺激または $20 \mu g/ml$ の PWM 刺激にて6日間培養し, 最後の24時間における Ig 産生量を EIA で測定した. (mean \pm SE)

第2表 RA, OA および正常人末梢血単核細胞の無刺激および PWM 刺激による Ig 産生量

	n	無刺激 Ig 産生量 (µg/ml)	PWM 刺激による Ig 産生量	
			µg/ml	刺激指数
RA 全体	27	0.14 ± 0.06	16.3 ± 7.74	357 ± 225
RF 高力価群	14	0.05 ± 0.02	1.67 ± 0.62	74.9 ± 45.0
RF 低力価群	13	0.24 ± 0.12	32.0 ± 15.0	569 ± 332
OA	7	0.04 ± 0.01	10.2 ± 5.60	384 ± 216
正常人	5	0.04 ± 0.02	5.32 ± 4.40	287 ± 230

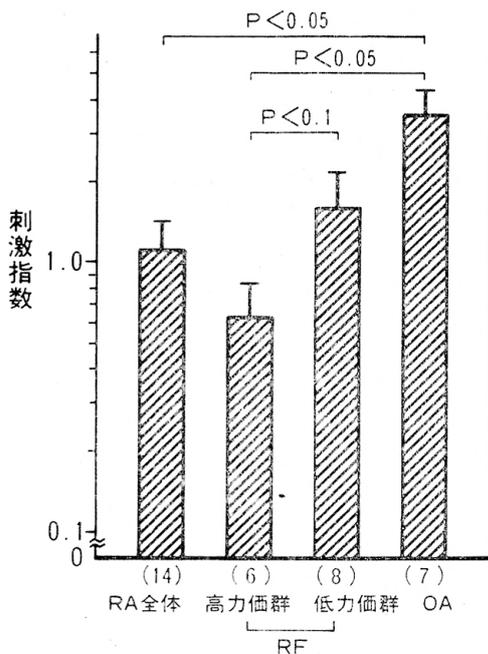
mean \pm SE, * $P < 0.1$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

PWM 刺激による Ig 産生量は第3図の様に平均では増加がみられなかったが、個々の症例でバラツキがみられたので刺激指数で比較した。RA 全体の刺激指数は第4図のように 1.10 ± 0.31 であった。RF 高力価群では 0.62 ± 0.21 と RF 低力価群の 1.59 ± 0.58 より低い傾向を示し、OA 群 3.53 ± 0.76 に比べて有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。これらの値はいずれも第2表に示した末梢血単核細胞の刺激指数に比べ著しく低かった。

3. 末梢血単核細胞の agg. IgG 刺激による Ig 産生および IgM RF 産生

agg. IgG 刺激による末梢血単核細胞の Ig 産生を刺激指数で表わすと、RA 全体では 1.71 ± 0.61 であった。RF 高力価群の刺激指数は 2.78 ± 1.28 と RF 低力価群の 0.99 ± 0.38 、OA 群の 0.86 ± 0.22 および正常人群の 0.85 ± 0.08 に比べ高い傾向を示した (第5図)。

agg. IgG 刺激による末梢血単核細胞の IgM RF 産生を検討した (第6図)。無刺激時の IgM RF 産生にばらつきが大きいので第6図は刺激指数で表わした。検出限界以上の IgM RF を産生したのは RA 18例中●印で示した10例であった。それらのうち agg. IgG 刺激により IgM RF 産生の有意の上昇が認められたのは、RF 高力価群の2例のみであった。OA 群および正常人



第4図 RA および OA 滑液単核細胞の PWM 刺激による Ig 産生量 (刺激指数)

第3図の無刺激時の Ig 産生量を1とし、PWM 刺激時の Ig 産生量を刺激指数で表わした。(mean ± SE)

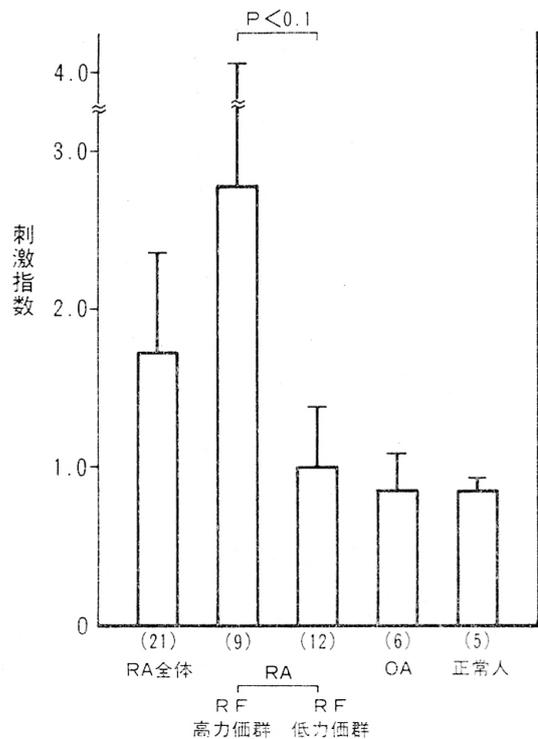
群の agg. IgG 刺激による末梢血単核細胞の IgM RF 産生は○印で示したが、すべて検出限界以下であった。

4. 滑液単核細胞の agg. IgG 刺激による IgM RF 産生

IgM RF 産生を刺激指数で表わし第6図に示した。検出限界以上の IgM RF 産生をみたのは●印で示す高力価群の1例のみであり、RF 低力価群と OA 群では agg. IgG 刺激による IgM RF 産生はみられなかった。

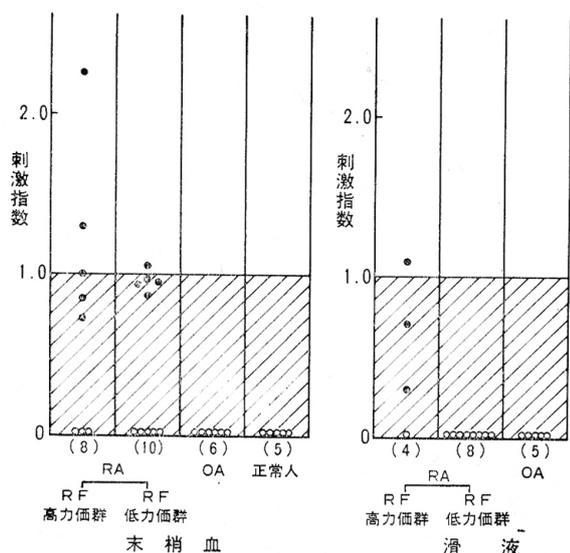
5. RA の末梢血および滑液T細胞の IL-2 産生能

RA 末梢血T細胞の IL-2 産生能は第7図左側カラムに示す如く、RF 高力価群は低力価群および中央カラム正常人群に比較し、平均では有意差はなかった。ここで、正常人群の95%正常域を求めると(ノン・パラメトリック法¹⁷⁾) 1100 cpm がその下限となった。RF 高力価群では正常下限以下の例が4例あり、正常人群に比べ低値を示す例が多かった (χ^2 検定, $p < 0.05$)。IL-2 低値群では PWM 刺激 Ig 産生量が低い傾向で、agg. IgG



第5図 末梢血単核細胞の agg. IgG 刺激による Ig 産生

RA, OA, 正常人の末梢血単核細胞 ($1 \times 10^6 / \text{ml}$) を $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の agg. IgG 刺激にて6日間培養し、最後の24時間における Ig 産生量を無刺激時の Ig 産生量との比 (刺激指数) で表わした。(mean ± SE)



第6図 末梢血および滑液単核細胞の agg. IgG 刺激による IgMRF 産生量

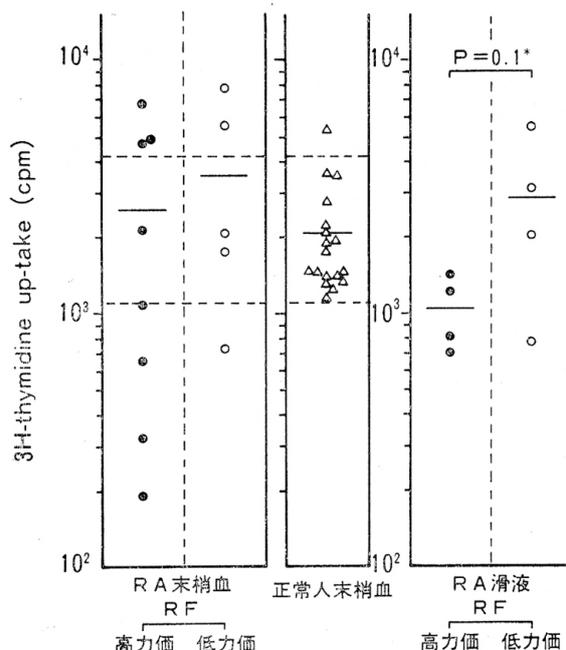
RA, OA, 正常人の末梢血および RA, OA 滑液中の単核細胞 ($1 \times 10^6/ml$) を $10 \mu g/ml$ の agg. IgG 刺激にて6日間培養し, 上澄中に最後の24時間に産生された IgMRF を EIA にて測定した。(○)は測定限界以下の(●)は測定限界以上の IgMRF 産生が認められた症例を表わす。測定限界以上の IgMRF 産生がみられた症例において無刺激時との比(刺激指数)で表わした。斜線の部分は刺激指数1以下で IgMRF の産生増加を認めなかった症例を示す。

刺激 Ig 産生量は高い傾向を示したが, 症例が少ないためデータは示さなかった。

右カラムに示す滑液 T 細胞の IL-2 産生能は RF 高力価群が RF 低力価群に比べて低値をとる傾向を示した。

考 察

RA に免疫異常の存在することが注目され, RA の診断や治療に応用されるようになってきている。とくに最も病変の強い関節局所を選び, 滑膜や滑液を用いる研究が RA に関するいろいろな新知見を提供している^{3,6,8-13}。滑膜そのものの研究は重要であるが, その入手は限られ, 研究にも大きな障壁となっている。そこで, 次善の策として末梢血中および滑液中の単核細胞の免疫学的特徴を Ig 産生能, IgM RF 産生能, IL-2 産生能を指標とし, その両者について比較検討したものである。本研究ではこれらの成績を免疫異常の指標として重要な血清 RF 値により層別化して, さらに検討していることが従来の研究ではみられていない点である。



第7図 RA の末梢血および滑液中 T 細胞の IL-2 産生能

RA および正常人末梢血ならびに RA 滑液中の T 細胞 ($2.5 \times 10^6/ml$) の 1% PHA-M 刺激による IL-2 産生能を IL-2 dependent cell line を用いて 3H -thymidine uptake で表わした (cpm)。正常人末梢血 T 細胞の IL-2 産生能の 95% 正常域 (ヨコ点線で示す) は $1100 \sim 4200$ cpm となり, RF 高力価 RA 末梢血では 4 例が正常下限以下の値を示した。各カラムの横線は平均値, *印は片側検定を示す。

単核細胞の Ig 産生能をみる培養系に関しては, 各研究者により若干異なるもののその成績はほぼ一致している。すなわち, 健康人末梢血単核細胞の PWM に対する反応性は, 3H -thymidine の取り込みでは培養 3~4 日目^{18,19}に, プラック形成法では 5~7 日目^{18,20}に頂値に達する。また培養上澄中の累積 Ig 産生量では, 健康人^{21,22}, RA 患者²¹ともに 8~9 日で頂値に達する。これに対し RA 患者末梢血単核細胞の agg. IgG 刺激応答は, 3H -thymidine の取り込みおよびプラック形成法では 3~5 日間培養²³⁻²⁵, また Ig 産生量では 5~7 日間培養^{26,27}で頂値を示す。Ig 産生量を用いた本研究での頂値は 6 日で, これら従来の報告とほぼ同じであった。

至適抗原濃度についての検討で, agg. IgG $10 \mu g/ml$ の刺激で Ig 産生量は頂値を示した。これは, Tao ら²⁷が精製した agg. IgG (heavy aggregates) を用い至適濃度とした $0.1 \mu g/ml$ より高濃度であったが, これ

はわれわれの用いた抗原が非精製物であり、抗原の重合度が低かったこと、また培養期間が Tao らの14日間よりも短く、さらに彼らのように PWM 刺激を併用しなかった等の培養条件の違いが原因となっている可能性がある。agg. IgG を抗原として用いる系では Fc レセプターを介した非特異的反応が問題となる。そこで、還元アルキル化した agg. IgG で非特異的反応を防止した系と未処理の agg. IgG を用いた系とを比較検討した。その結果、Ig 産生が刺激指数で正の相関を示しており、未処理 agg. IgG も Fc レセプターを介した非特異的反応でないことを確認した。

本研究では、末梢血単核細胞の無刺激による Ig 産生量は、RF 高力価群で対照の OA, 健常人と同程度であったのに対し、RF 低力価群では平均 0.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と高値を示す傾向がみられた。従来報告では、RA 末梢血単核細胞の無刺激 Ig 産生量は対照と差がない⁶⁾ というものと、増加しているとする成績²⁸⁾あるいは RA の一部で増加を認めるとする報告⁸⁾ などがある。しかしこれらは血清 RF 力価との関連には触れておらず、対象 RA 患者の異質性 (heterogeneity) に帰するものと考えられる。

本研究で、免疫異常のより強い RF 高力価群で無刺激 Ig 産生量が増加していなかったことは、免疫調節系のフィードバック機構により調節されていることを示すものかもしれない。また、多クローン性の B 細胞活性化を伴わない RF 産生 B 細胞の特異的活性化を示唆するものかもしれない、今後なお追求する必要がある。

RA 末梢血単核細胞の PWM 刺激による Ig 産生量は、無刺激に比較し、RF 高力価群でも RF 低力価群でも増加を示した。しかし、RF 高力価群は RF 低力価群に比較し有意に低値を示した。このような血清 RF の力価の違いによる PWM 刺激 Ig 産生量の差を示した報告はみられていない。従来、RA 単核細胞の PWM 刺激 Ig 産生量は正常^{3,6,8)}あるいは低値^{4,5,7)}、逆に一部は高値という記載^{6,8)}もあり、一定していない。

PWM はマクロファージ・T細胞依存性 B 細胞マイトゲン²⁹⁾である。RF 高力価群が RF 低力価群より PWM 刺激による Ig 産生量がかえって低値を示した要因としては、次の理由があげられる。すなわち、(1) B 細胞が *in vivo* ですでに活性化されているため、新たな刺激に反応しない、(2) サプレッサー細胞機能の増加、(3) ヘルパー T 細胞機能の低下、(4) 抑制性単球の存在、などの可能性である。このうち、(1) RA の B 細胞について、無刺激での Ig 産生や RF 産生などから、*in vivo* ですでに

活性化を示唆しているとする報告^{6,12,13)}もある。しかし、本研究で示した RF 高力価群においては正常者と差がなく、B 細胞の *in vivo* での活性化にもとづく低反応とは考えられなかった。次に、(2) RA の Concanavalin A 誘導非特異的 サプレッサー細胞機能については、低下³⁰⁻³²⁾あるいは正常³²⁾とする報告のみで増加の報告はない。そこでサプレッサー T 細胞機能亢進による PWM 低反応性は考えにくい。(3) ヘルパー T 細胞機能については、Algom ら³³⁾が組み換え培養系を用いて PWM 刺激における RA のヘルパー T 細胞機能の低下を報告している。本研究の対象症例でもこの可能性、つまり免疫異常の強いと考えられる RF 高力価群に非特異的的刺激に対するヘルパー T 細胞の機能低下が示唆される。(4) の抑制性マクロファージについては、免疫異常の代表的疾患である活動性 SLE において、PWM に対する反応性の低下にその関与が証明されている³⁴⁾。RF 高力価 RA においてもこの可能性は否定できない。

結局、RF 高力価群で PWM 反応性の低い理由は、抑制性マクロファージの関与は否定できないが、ヘルパー T 細胞機能の低下がもっとも考えられる。

RA 滑液単核細胞の無刺激による Ig 産生量は、末梢血単核細胞に比べて低値を示していた。滑液単核細胞の Ig 産生量が低いのは、OA でも同様に低いことから滑液中の免疫担当細胞に共通する何らかの要因があるかもしれない。これに対し、仲村ら⁶⁾は滑液単核細胞の7日間の累積 IgG 産生量は末梢血単核細胞より亢進していたと報告している。本研究では続く実験で、抗原として agg. IgG を用いており、培養上澄より抗原を除く必要があるが、累積 Ig 産生は求めていない。無刺激ではあるが、agg. IgG 刺激と同じ条件の培養5日目から6日目にかけての24時間での Ig 産生量を測定した。この培養条件の違いにより異なった成績が得られたのではないかと思われる。

滑液単核細胞の PWM 刺激による平均 Ig 産生量は末梢血に比して著しく低かった。無刺激 Ig 産生量が症例により異なるので、PWM 刺激による症例毎の変動をみるために、無刺激 Ig 産生量を1とした刺激指数でみると、RF 高力価群では対照 OA に比し有意な低値を示していた。RA 滑液単核細胞の PWM に対する低反応は仲村ら⁶⁾、Petersen ら³⁵⁾によっても報告されている。RA 滑液単核細胞の PWM 低反応性の原因は、末梢血単核細胞と同様に前記4つの可能性が考えられる。(1) B 細胞について、仲村ら⁶⁾は RA 滑液 B 細胞の無刺激での Ig 産生の亢進を認めている。その結果滑液

単核細胞が *in vivo* ですでに活性化されているため新たな PWM 刺激に対する反応性が低下していると考按している。本研究の成績では、無刺激での Ig 産生亢進は必ずしも認められず、この可能性は考えにくい。(2)ヘルパー T細胞および(3)サプレッサー T細胞については、RA 滑液 B細胞を正常人の T細胞と培養することにより PWM に対する反応性が回復する成績があり^{6,36,37)}、RA 滑液中ヘルパー T細胞の低反応を示唆している。しかし、RF 高力価群では刺激指数でみて無刺激より減少していたことは、Veys ら³⁸⁾、Fox ら³⁹⁾、Petersen ら⁴⁰⁾の成績にみられるようにサプレッサー T細胞が関与している可能性もある。(4)抑制性マクロファージについては、RA 滑液中のマクロファージを除去することにより、PWM 反応性がさらに低下するという Pertersen ら⁴¹⁾の報告からは否定的である。

結局、RF 高力価群で滑液単核細胞の PWM 反応性低下がみられた理由として、サプレッサー T細胞の関与も否定できないが、ヘルパー T細胞機能の低下がもっとも考えられる。

末梢血単核細胞の agg. IgG 刺激による Ig 産生増加と IgM RF 産生増加は RF 高力価群にみられた。Pisco ら²⁵⁾は agg. IgG 刺激は多クローン性にリンパ球を刺激して正常 B細胞にも RF 産生を促したと報告している。しかし本研究の対象症例では、OA、正常人では RF 産生はみられず、疾患特異的であった。本研究では、Tao ら²⁷⁾が用いた抗原特異的抗体応答を示す至適刺激濃度に近い 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を用いており、100~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の高濃度を用いた Pisco ら²⁵⁾の方法とは異なっていたためと考えられる。

RF 高力価群の末梢血単核細胞は非特異刺激である PWM に対しては低反応であった。しかし疾患特異抗原である agg. IgG に対して RF 産生がみられたことから、非特異的なヘルパー機能の低下と同時に抗原特異的な Tおよび B細胞の活性化が示唆され、RA における免疫応答の不均衡が考えられた。

一方炎症局所である RA 滑液中の単核細胞は、無刺激でも僅かながら IgM RF 産生のみられたものがあつた(第6図、●印)。しかし、agg. IgG 刺激でその産生の増加はみられず、末梢血単核細胞とは異なっていた。RA 滑液単核細胞が agg. IgG に対して反応しなかった理由として、(1) *in vivo* ですでに活性化されているため新たな agg. IgG 刺激に対して反応しない。(2)滑液単核細胞の分画については B細胞の減少⁴²⁾と T細胞、特に T8 細胞の増加^{36,39)}が報告されており、末梢血と構成が

異なるための2つの可能性が考えられる。

IL-2 産生能を T細胞機能の一指標として検討したところ、RA 末梢血 T細胞の IL-2 産生能は RF 高力価群で正常域より低い症例が多く認められた。これに対し、RF 低力価群では正常域より低い症例は5例中1例のみであった。RA の末梢血 T細胞の IL-2 産生能について、増加⁴³⁾、正常^{44,45)}、低下^{46,47)}の三通りの報告がみられている。これらは本研究のように層別化していないので、どのような対象を選んだかが結果に影響したのではないかと思われる。

次に、滑液 T細胞の IL-2 産生能は RF 高力価群で低力価群に比し低値の傾向を示した。滑液中の IL-2 活性は高いと報告されているが^{48,49)}、滑液 T細胞の IL-2 産生能については逆に低下しているといわれている^{45,47)}。われわれの症例でもとくに RF 高力価群で滑液中 T細胞の IL-2 産生能は低い傾向が認められた。無刺激での IL-2 産生能はみていないが、滑液中の IL-2 活性が高いという報告とを合せると、*in vivo* ですでに活性化されており、新たな PHA 刺激による IL-2 産生がみられなかった可能性が最も考えられる。しかし、IL-2 産生細胞自体の異常も否定できない。

以上、血清 RF 高力価群の *in vitro* の系でみられた免疫異常をまとめると、末梢血単核細胞は非特異的な PWM 刺激に対して低反応であった。また、疾患特異抗原である agg. IgG に対しては反応を示し、滑液 T細胞の IL-2 産生能は低下の傾向を示した。すなわち、一般的なヘルパー T細胞の機能低下の一方、agg. IgG に対して特異的に反応するクローンの活性化が認められ、免疫応答系の不均衡が存在していた。今後は抗原特異的な免疫制御機構の面からの解析が必要と思われる。

ま と め

RA の免疫異常を解析する目的で、RA の末梢血および滑液単核細胞それぞれの無刺激および PWM, agg. IgG 刺激の培養6日目における抗体産生能を OA および正常人を対照に比較検討した。さらに T細胞機能の指標として PHA で誘導される IL-2 産生能を検討し、以下の結果を得た。

1. RA 末梢血単核細胞の無刺激での Ig 産生能は RF 高力価群で低力価群に比して低下の傾向を示した。PWM 刺激による Ig 産生能は RF 高力価群で低力価群および OA に比し有意に低下していた。agg. IgG 刺激による Ig 産生能は RF 高力価群で逆に高い傾向を示した。

2. RA 滑液単核細胞の Ig 産生能は RF 高力価群で、無刺激で差はなく PWM 刺激では低力価群に比して低値を示す傾向があった。PWM 刺激 Ig 産生能は対照 OA に比し有意に低値を示した。

3. 末梢血単核細胞の agg. IgG 刺激による in vitro IgM RF 産生の増加が RF 高力価群にみられたが、低力価群、OA および正常人にはみられなかった。

4. RA 滑液単核細胞の agg. IgG 刺激による in vitro IgM RF 産生の増加はみられず、末梢血単核細胞とは異なっていた。

5. RA 末梢血T細胞の IL-2 産生能は RF 高力価群で産生量の低い症例が有意に多く認められた。滑液T細胞の IL-2 産生能は RF 高力価群で低力価群に比して低値の傾向を示した。

以上より、RF 高力価群は低力価群に比べて非特異的なヘルパー機能の低下と同時に、抗原特異的なTおよびB細胞のより強い活性化が示唆された。

稿を終えるに当り、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科本間光夫教授、防衛医科大学校第一内科原まさ子講師、川越光博講師に深甚より感謝致します。また、終始、御鞭撻、御協力を頂きました国立療養所村山病院中山昇二院長、同整形外科鈴木三夫臨床研究部長、防衛医科大学校整形外科新名正由助教授に心より謝意を表します。

本論文の要旨の一部は第27回日本リウマチ学会総会および第33回日本アレルギー学会総会において発表した。

本研究の研究費は、厚生省自己免疫疾患調査研究班および厚生省国立療養所地区個別研究費から援助を受けた。

文 献

- 1) Carson, D.A.: Rheumatoid factor. Textbook of Rheumatology. (Ed.) Kelly, W.N., Harris, E.D., Ruddy, S., Sledge, C.B., W.B. Saunders Co., Philadelphia, p. 677~690, 1981
- 2) Harris, E.D.: Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *ibid.*, p. 896~927
- 3) Stratton, J.A., Peter, J.B.: Response of synovial fluid and peripheral blood lymphocytes to in vitro stimulation. *Arthritis Rheum.*, 15: 457, 1972
- 4) Lance, E.M., Knight, S.C.: Immunologic reactions and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 17: 513~521, 1974
- 5) Koopman, W.J., Schrohenloher, R.E.: Enhanced in vitro synthesis of IgM rheumatoid factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 23: 985~992, 1980
- 6) 仲村恒敬, 柏戸敬道, 奥平邦雄, 他: 慢性関節リウマチ関節液リンパ球の in vitro 免疫グロブリン合成. *リウマチ* 21: 290~297, 1981
- 7) Poikonen, K., Oka, M., Möttönen, T. et al.: Synthesis of IgM, IgG. and IgA in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 41: 607~611, 1982
- 8) Patel, V., Panayi, G.S., Unger, A.: Spontaneous and pokeweed mitogen induced in vitro immunoglobulin and IgM rheumatoid factor production by peripheral blood and synovial fluid mononuclear cells in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 10: 364~372, 1983
- 9) Panayi, G.S.: Response of rheumatoid synovial fluid lymphocytes to non-specific mitogens. *Lancet*, 2: 512~513, 1973
- 10) Corrigan, V., Panayi, G.S., Laurent, R.: Lymphocyte studies in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.*, 8: 10~16, 1979
- 11) Petersen, J., Andersen, V., Hansen, T.I. et al.: Synovial fluid monocyte: Influence on lymphocyte proliferation and secretion of immunoglobulins (abstract). *Revue du Rhumatisme. Numero Special*, abster no 0077, 1981
- 12) 小川博遊, 桜美武彦, 井村裕夫: 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. *日臨免会誌* 5: 183~189, 1982
- 13) Egeland, T., Lea, T., Mellbye, O.J. et al.: Quantitation of cells secreting immunoglobulins after elution from rheumatoid synovial tissue. *Scand. J. Immunol.*, 16: 413~419, 1982
- 14) Ropes, M.W., Bennett, G.A., Caleb, S. et al.: 1958 revision of diagnostic criteria for rheumatoid arthritis. *Bull. Rheum. Dis.*, 9: 175~176, 1958
- 15) Böyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21: suppl. 97: 77~89, 1968

- 16) Zvaifler, N.J., Schur, P.: Reactions of aggregated mercaptoethanol treated gammaglobulin with rheumatoid-precipitin and complement fixation studies. *Arthritis Rheum.*, 11: 523~536, 1968
- 17) 上村 桂: 医統計学, p. 82, 文永堂, 東京, 1979
- 18) 船渡忠男, 今井博康, 西田陽, 他: ヒトBリンパ球活性化機構に関する研究. *臨床病理* 31: 185~188, 1983
- 19) Fauci, A.S., Whalen, G., Burch, C.: Activation of human B lymphocytes. *Cellular Immunol.*, 54: 230~240, 1980
- 20) Fauci, A.S., Pratt, K.R.: Activation of human lymphocytes. *J. exp. Med.*, 144: 674~684, 1976
- 21) Tsoukas, C.D., Carson, D.A., Fong, S. et al.: Cellular requirements for pokeweed mitogen-induced autoantibody production in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.*, 125: 1125~1129, 1980
- 22) 船渡忠男, 押川朋子, 梅谷直樹, 他: ヒトBリンパ球活性化機構に関する研究. *臨床病理* 31: 1001~1129, 1983
- 23) Kinsella, T.D.: Enhancement of human lymphocyte transformation by aggregated human gammaglobulin. *J. Clin. Invest.*, 53: 1108~1114, 1974
- 24) Reynolds, M.D., Abdou, N.I.: Comparative study of the in vitro proliferative responses of blood and synovial fluid leukocytes of rheumatoid arthritis patients. *J. Clin. Invest.*, 52: 1627~1531, 1973
- 25) Pisco, E.J., Turner, R.A., Foster, S.L.: Induction of human rheumatoid factor producing cells by aggregated IgG. *Arthritis Rheum.*, 25: 1108~1116, 1982
- 26) Yamasaki, K., Ziff, M.: Enhancement of in vitro immunoglobulin synthesis of rheumatoid lymphocytes by aggregated human gammaglobulin. *Arthritis Rheum.*, 20: 679~684, 1977
- 27) Tao, X.L., Olsen, N., Ziff, M. et al.: Human IgG aggregates induce selective stimulation of IgM rheumatoid factor synthesis by rheumatoid blood mononuclear cells. *Arthritis Rheum.*, 27: 502~508, 1984
- 28) Nakamura, T., Miyasaka, N., Pope, R.M. et al.: Immunomodulation by isoprinosine: effects on in vitro immune functions by lymphocytes from humans with autoimmune diseases. *Clin. exp. Immunol.*, 52: 67~74, 1983
- 29) 中野昌康: マイトージェンによるBリンパ球活性化の機序. *臨床免疫* 16: 12~19, 1984
- 30) Sakane, T., Taniguchi, Y., Honda, M. et al.: Suppressor T cell activity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ryumachi*, 21 (Suppl.): 115~122, 1981
- 31) 原 まさ子: 免疫抑制療法-SIRS (Soluble immune response suppressor). *免疫と疾患* 5: 455~459, 1983
- 32) Abe, T., Takeuchi, T., Koide, J. et al.: Suppressor T cell function in patients with rheumatoid arthritis complicated by vasculitis. *Arthritis Rheum.*, 27: 752~759, 1984
- 33) Algom, D., Jodouin, C.A., Dunne, J.V. et al.: Quantitative and qualitative impairment of immunoregulatory cells in the circulation of rheumatoid arthritic patients. *Scand. J. Rheumatol.*, 13: 155~162, 1984
- 34) 吉田俊治: ヒトリンパ球のリポ多糖刺激に対する反応性とそれに及ぼす単球の役割. —健康人及び全身性エリテマトーデス患者における検討—*慶應医学* 60: 283~294, 1983
- 35) Petersen, J., Andersen, V., Ingemann-Hansen, T. et al.: Synovial fluid and blood monocyte influence on lymphocyte proliferation in rheumatoid arthritis and traumatic synovitis. *Scand. J. Rheumatol.*, 12: 299~304, 1983
- 36) Romain, P.L., Burmester, G.R., Enlow, R.W. et al.: Multiple abnormalities in immunoregulatory function of synovial compartment T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.*, 2: 121~127, 1982
- 37) Kluin-Nelemans, H.C., van der Linden, J.A., Gmelig Meyling, F.H.J. et al.: HLA-DR positive T lymphocytes in blood and synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 11: 272~276, 1984
- 38) Veys, E.M., Hermanns, P., Verbruggen, G. et al.: Evaluation of T cell subsets with monoclonal antibodies in synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 9: 821~826, 1982
- 39) Fox, R.I., Fong, S., Sabharwal, N. et al.: Synovial fluid lymphocytes differ from peripheral blood

- lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis
J. Immunol., 128: 351~354, 1982
- 40) Peterson, J., Ingemann-Hansen, T., Halkjer-Kristensen, J.: Spontaneous and induced immunoglobulin secretion by synovial fluid B lymphocytes in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis., 43: 140~145, 1984
- 41) Petersen, J., Halkjer-Kristensen, J., Ingemann-Hansen, T.: Synovial fluid and blood monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis. Scand. J. Rheumatol., 13: 265~272, 1984
- 42) Føland, S.S., Natvig, J.B., Husby, G.: Immunological characterization of lymphocytes in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. Scand. J. Immunol., 2: 67~73, 1973
- 43) Tan, P., Shore, A., Leary, P. et al.: Interleukin abnormalities in recently active rheumatoid arthritis. J. Rheumatol., 11: 593~596, 1984
- 44) 宮城 淳, 武田 昭, 益山純一, 他: 膠原病患者におけるプロテインA誘導インターロイキン2産生能. 医学のあゆみ 128: 729~731, 1984
- 45) 仲村恒敬, 柏戸敬道, 中野啓一郎, 他: 慢性関節リウマチ患者関節液中リンパ球の IL-2 産生および反応異常. 医学のあゆみ 129: 759~761, 1984
- 46) Miyasaka, N., Nakamura, T., Russell, I.J. et al.: Interleukin 2 deficiency in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Clin. Immunol. Immunopathol., 31: 109~117, 1984
- 47) Combe, B., Pope, R.M., Fischbach, M. et al.: Interleukin-2 in rheumatoid arthritis: production of and response to interleukin-2 in rheumatoid synovial fluid, synovial tissue and peripheral blood. Clin. exp. Immunol., 59: 520~528, 1985
- 48) Wilkins, J.A., Warrington, R.J., Sigurdson, S.L. et al.: The demonstration of an interleukin-2 like activity in the synovial fluids of rheumatoid arthritis patients. J. Rheumatol., 10: 109~113, 1983
- 49) Nouri, A.M.E., Panayi, G.S., Goodman, S.M.: Cytokines and the chronic inflammation of rheumatic disease. II. The presence of interleukin-2 in synovial fluids. Clin. exp. Immunol., 58: 402~409, 1984

ABSTRACT

Analysis of immunoglobulin, IgM rheumatoid factor and interleukin-2 production by peripheral blood and synovial fluid mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis

Osamu Noguchi, M.D.

Department of Internal Medicine, Murayama
Byoin National Sanatorium

The in vitro productions of immunoglobulin (Ig), IgM rheumatoid factor (IgMRF) and interleukin 2 (IL-2) by peripheral blood (PBMN) and synovial fluid (SFMN) mononuclear cells were studied in patients with rheumatoid arthritis (RA). The patients were divided into two groups by their serum IgM RF titers (patients with high RF and low RF).

The amounts of Ig produced spontaneously by PBMN from patients with high RF were lower than those produced by PBMN of patients with low RF. Similarly, the amounts of Ig produced by pokeweed mitogen stimulated PBMN from patients with high RF were less as compared to those produced by PBMN from RA patients with low RF or patients with osteoarthritis.

In contrast, when the PBMN were cultured in the presence of aggregated IgG, the amounts of Ig in the culture supernatants was greater in RA patients with high RF than in patients with low RF, patients with osteoarthritis or normal subjects.

When the PBMN were stimulated by aggregated IgG, significant amounts of IgM RF was produced in 10 out of 18 RA patients. However, PBMN of patients with osteoarthritis or normal subjects did not secrete measurable amounts of IgM RF.

The amounts of Ig produced by pokeweed mitogen stimulated SFMN from RA patients

with high RF were less than those produced by SFMN of RA patients with low RF or osteoarthritic patients. Production of IL-2 by T cells isolated from peripheral blood or synovial fluid was impaired in RA patients with high RF.

These results suggest that in RA patients with

high RF, while non-specific T helper functions are impaired, the specific immune responses to aggregated IgG are enhanced. Further studies on the mechanisms involved for these functional alterations should provide us with insights of pathogenesis of RA.