

〔原 著〕

## スギ花粉抗原による末梢血リンパ球の増殖反応と 免疫グロブリン産生反応について

たかの橋中央病院耳鼻咽喉科

林 鷹治

広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室

林 賢

たかの橋中央病院内科

城 智彦

広島大学分子生命機能科学専攻

重田征子 小埜和久

産業医科大学医学部免疫学教室

山下優毅

正常者とスギ花粉症患者の末梢血単核細胞を mitogen やスギ花粉抗原で刺激培養し、リンパ球の増殖反応と免疫グロブリン産生反応を検討した。Con A, anti-CD40mAb 刺激で、患者群の増殖反応は正常者群に比し有意に高く、anti-CD40mAb 刺激で両群共に IgG 2 産生反応が顕著であった。スギ抗原刺激で、患者群の増殖反応は正常者群に比し著しく高く、患者血清抗スギ IgE 抗体価と相関した。スギ抗原刺激による IgE 産生反応では、患者群の反応は正常者群に比し有意に高く、患者血清抗スギ IgE 抗体価と相関を示した。スギ花粉抗原刺激による IgG 産生反応では正常者群、患者群共にやや高い反応を示し、両者の間に有意差は認められなかった。どの IgG サブクラスが IgG 産生反応の主因であるかは不明であったが、IgG 2 と IgG 4 産生反応は他のサブクラスに比べて比較的高値を示した。患者群の IgG 4 産生反応は正常者群に比し有意に高かった。IgG 2 と IgG 4 産生反応の間、並びに、IgG 4 と IgE 産生反応の間に負の相関傾向がみられ注目された。免疫治療における IgG 4 high responder を今回の *in vitro* 反応で判定する事は困難と思われた。

**Key words :** Cry j I — IgE production — IgG 2 production — IgG 4 production —  
Japanese cedar pollinosis

はじめに

Received : July 7, 1998

Accepted : December 15, 1998

**Abbreviations :** BSA bovine serum albumin ;  
CJP chromatography of 80% ammonium sulfate  
precipitate ; Con A concanavalin A ; FCS fe-  
tal calf serum ; PBMC peripheral blood  
mononuclear cells ; PBS phosphate buffered sa-  
line ; PWM pokeweed mitogen

I 型アレルギーに対する免疫治療において、IgG 4 抗体の誘導が重要であることが指摘されている。しかし、スギ花粉症に対する免疫治療<sup>1)</sup>では、頻回の抗原注射が厳重に継続されていても、IgG 4 抗体の高度増加を達成できる比率は 24% と低く、治療前の血清中 IgE 抗体価が高い症例ほど抗原注射による IgG 4 抗体反応

の反応性が高い傾向がみられる中で、治療前 IgE 抗体価の高い症例に頻回の抗原注射が継続されても IgG 4 抗体上昇がほとんど観察されない例がかなり存在することも明らかにされている。これらの成績より、どのような個体に対しても十分な IgG 4 抗体反応を惹起し得るスギ花粉成分を精製分離すること、免疫治療開始前に個体の IgG 4 抗体反応性を予知する方法を開発すること、の 2 点がスギ花粉症免疫治療の重要課題であると思われる。

今回私共は、ヒト末梢血リンパ球を mitogen やスギ花粉抗原と共に培養し、増殖反応や IgE, IgG, IgG サブクラス産生反応などを詳細に検討して、スギ花粉症免疫治療における IgG 4 high responder を治療前に予知選別する方法はないものか、その手がかりを探る目的で以下の研究を行った。

## 対 象

1996 年 1 月より 1998 年 2 月までに、たかの橋中央病院耳鼻咽喉科（広島市）を訪れ、トリイ製スギ花粉診断エキスによる皮内反応陽性並びに SRL 社において CAP 法フルオロエンザイムイムノアッセイにて測定された血清中抗スギ IgE 抗体価陽性を示したスギ花粉症患者で免疫治療や薬物治療を全く受けていない未治療者群より、CAP 法 IgE 抗体価が 0.35～100 U<sub>A</sub>/ml に広がるよう作為的に 50 名（14～43 歳，男女）を選び出し、対照として、スギ花粉診断エキス皮内反応陰性、CAP 法による血清中抗スギ IgE 抗体価陰性の非アトピー正常者 38 名（23～51 歳，男女）を無作為に選び、これら 88 名を対象とした。尚、スギ花粉症患者の場合、実験に問題となる様な重複感作例は対象から除外した。

## 方 法

### 1) 末梢血単核細胞の分離

スギ花粉が飛散する 2 月から 5 月迄を除く期間に、肘静脈よりヘパリン加末梢血を採取しリンパ球分離液（Nycomed Pharma As）に静かに重層し、250×g 室温にて 30 分遠心した。遠心後中間層より単核細胞（peripheral blood mononuclear cells, PBMC）を分離し、phosphate buffered saline (PBS) にて 3 回洗浄した後

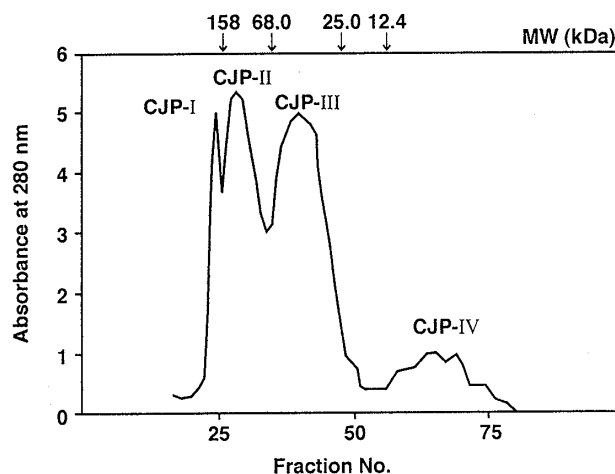


Fig. 1. Chromatography of 80% ammonium sulfate precipitate (CJP) in Japanese cedar pollen extract with PBS on Hiload Superdex 75 pg 26/60 column equilibrated with 0.15 M ammonium acetate (pH 6.0).

10% 熱処理胎児ウシ血清（fetal calf serum, FCS, Gibco）を含む RPMI-1640 培養液（Nissui）に浮遊させた。

### 2) スギ花粉粗抗原の分画

スギ花粉 400 g を 4 l の PBS に 4 時間懸濁し、上清を 80% 飽和硫酸で沈殿した後、蒸留水に対して透析し全量 70 ml に調整したものを CJP とした。得られた CJP を Hiload システム（Pharmacia）にて Superdex 75 pg 26/60 カラム（Pharmacia）を用いてゲル濾過し 280 nm 吸光度を測定したところ 4 つのピークを成し、それぞれを CJP-I, CJP-II, CJP-III, CJP-IV とした。分子量により 4 つのピークを分画すると、CJP-I は 158 kDa 以上、CJP-II は 158～68 kDa, CJP-III は 68～12.4 kDa, CJP-IV は 12.4 kDa 以下であることが明らかとされ、したがって、CJP-III は *Cry j* I と *Cry j* II を含む画分として、CJP-II はそれら主要スギ花粉アレルゲンを含まない分子量の比較的大きい画分として実験に供された (Fig. 1)

### 3) スギ花粉抗原

培養された PBMC を刺激するスギ花粉抗原として、スギ花粉粗抗原凍結乾燥末（トリイ）10 μg/ml, *Cry j* 1（林原）10 μg/ml, CJP-III 10 μg/ml, CJP-II 10 μg/ml の 4 種の抗原を使用した。

### 4) リンパ球 mitogen

今回の細胞培養系の成否を確認する目的と、mitogen に対して特異な免疫グロブリン産生反応がみられるか否かを検討するため、concanavalin A (Con A, EY

Laboratories) 10 µg/ml, pokeweed mitogen (PWM, Sigma) 5 µg/ml, mouse monoclonal anti-human CD40 antibody (anti-CD40 mAb, Serotec) 1 µg/ml をリンパ球 mitogen として使用した。

#### 5) リンパ球増殖反応

10% 熱処理 FCS, 2 mM グルタミン, 50 U/ml ペニシリン, 50 µg/ml ストレプトマイシンを加えた RPMI-1640 培養液にて細胞数  $1 \times 10^6$ /ml に調整された PBMC 浮遊液を 96 穴平底マイクロタイタープレート (No. 3072, Falcon) の well に 200 µl ずつ分注し, 抗原あるいは mitogen による刺激並びに無刺激条件下に各 3 well を使用して, 5% CO<sub>2</sub> 培養器にて 37°C 5 日間培養した。培養終了 20 時間前に 0.5 µCi のトリチウムチミジン (<sup>3</sup>H-TdR, specific activity 6.0 Ci/mM, Amersham Plc) を培養液に添加して標識チミジンを芽球化リンパ球 DNA へ取り込ませた。培養終了後 cell harvester によりグラスファイバーフィルター上にリンパ球を回収し, 液体シンチレーションカウンターで β 線の活性を測定した<sup>2)</sup>。増殖反応の成績は, 刺激時の放射活性取り込み cpm を非刺激時の放射活性取り込み cpm で除した値すなわち Stimulation Index で表した。

#### 6) 培養上清中免疫グロブリン産生量の測定

10% 熱処理 FCS, 2 mM グルタミン, 50 U/ml ペニシリン, 50 µg/ml ストレプトマイシンを加えた RPMI-1640 培養液にて細胞数  $5 \times 10^5$ /ml に調整された PBMC 浮遊液を 24 穴平底カルチャープレート (No. 3047, Falcon) の well に 1 ml ずつ分注し, 抗原あるいは mitogen による刺激並びに無刺激条件下に各 2 well を使用して, 5% CO<sub>2</sub> 培養器にて 37°C 7 日間培養した。培養終了後 well の内容を試験管に移し, 250 × g 4°C にて細胞を遠心分離した後, 上清を免疫グロブリン量測定まで -80°C に冷凍保存した。上清中の総 IgE, IgG, IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4 量の測定は, サンドイッチ ELISA 法により以下の方法で行われた。IgE 量の測定では, 96 穴平底マイクロタイタープレート (A/S Nunc) の well に ヒツジ抗ヒト IgE 血清 (Medix Biotech) 10 µg/ml PBS を 50 µl, IgG 並びに IgG サブクラス量の測定では, ヒツジ抗ヒト IgG 血清 (Cappel) 10 µg/ml PBS を 50 µl ずつ分注して 37°C 2 時間更に 4°C overnight 静置して well を各抗免疫グロブリン抗体にて coating した。well を PBS にて洗浄後, 1% bovine serum albumin (BSA) を含む PBS 200 µl を添加して well の残存吸着部を blocking した。well を洗浄した

後, IgE 量測定の場合は培養上清 50 µl を, IgG 並びに IgG サブクラス測定の場合は培養上清 25 µl を各 2 well に添加して 37°C 1 時間 incubation を行った。well を洗浄した後, IgE 量の測定では, PBS にて 400 倍に希釈されたペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ヒト IgE 血清 (Camarillo) 50 µl を, IgG 量の測定では, PBS にて 400 倍に希釈されたペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ヒト IgG 血清 (Camarillo) 50 µl を, IgG サブクラス量の測定では, PBS にて 5000 倍に希釈されたマウスモノクローナル抗ヒト IgG 1, IgG 2, IgG 3 あるいは IgG 4 抗体 (Caltag) 50 µl を添加し 37°C 1 時間 incubation を行った。更に IgG サブクラス量測定では, well を洗浄後 PBS にて 400 倍に希釈されたペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗マウス IgG 抗体 (Biosource International) 50 µl を注入し, 37°C 1 時間 incubation を行った。well を洗浄後, 基質呈色液として  $5.5 \times 10^{-4}$  M, O-Phenylenediamine Dihydrochloride (和光) を含む 0.01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液 50 µl を添加し, 室温にて 30 分 incubation を行った。最後に, well の反応液に 8 N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 µl を加え反応を停止させ, 直ちに Immuno Reader (NJ-2000, Japan Intermed) にて 490 nm 吸光度を測定した<sup>3)</sup>。免疫グロブリン量の測定成績は, IgG 量以外では刺激時の吸光度を非刺激時の吸光度で除した値, IgG 量では吸光度によらず, 既知 IgG 濃度液系列より検量線を作成して IgG 量を ng 単位に算出し, 同様に刺激時の IgG 量を非刺激時の IgG 量で除した値すなわち Stimulation Index で表した。

#### 7) 統計学的解析

mitogen 刺激による実験の各群成績は, mean ± standard error of the mean (SEM) で示し, 平均値の差の検定は, Student's-t test により, 危険率  $p < 0.05$  を有意と判定した。スギ花粉抗原刺激による実験の各群成績の差の検定は Mann-Whitney's U test により, 危険率  $p < 0.05$  を有意と判定した。相関係数 ( $r$ ) は Pearson 積率法による分析に従い, 検定は t-test により危険率  $p < 0.05$  を有意と判定した<sup>4)</sup>。

## 結 果

### 1. mitogen 刺激による末梢血リンパ球の増殖反応について

Con A, PWM, anti-CD40mAb 刺激による末梢血リンパ球増殖反応の成績を Fig. 2 に示した。Con A と

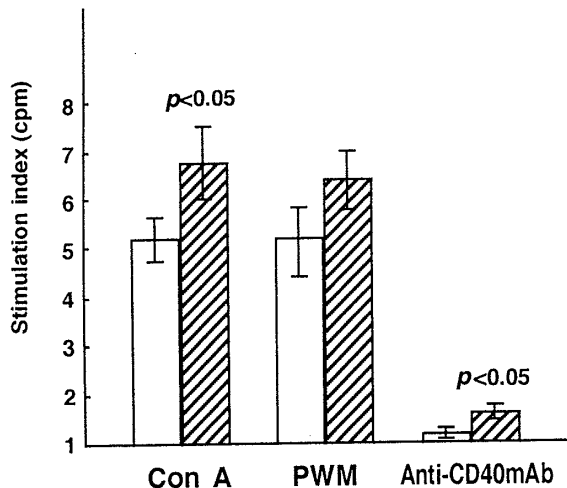


Fig. 2. Lymphocyte proliferative response to mitogens in cultured PBMC. Data represent the mean  $\pm$  SEM of stimulation indexes in normal subjects ( $\square$ ,  $n=20$ ) and Japanese cedar pollinosis patients ( $\text{hatched}$ ,  $n=20$ ). The levels of proliferation stimulated with Con A and anti-CD40mAb in pollinosis patients were significantly higher than those in normal subjects.  $p < 0.05$ .

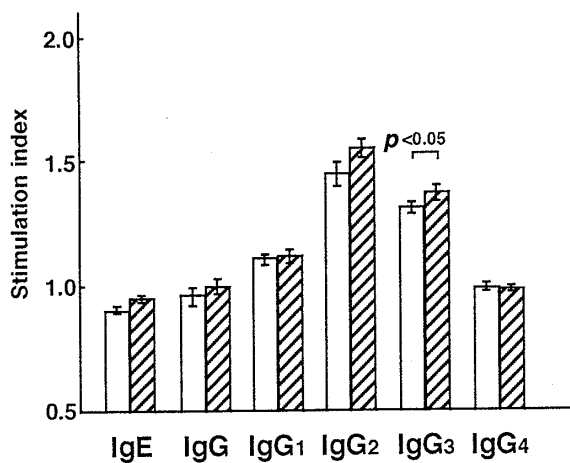


Fig. 3. Immunoglobulin production in cultured PBMC stimulated with anti-CD40mAb. Data represent the mean  $\pm$  SEM of stimulation indexes in normal subjects ( $\square$ ,  $n=20$ ) and Japanese cedar pollinosis patients ( $\text{hatched}$ ,  $n=20$ ). The levels of IgG 2 production in normal and pollinosis groups were highest among all the immunoglobulin classes and subclasses. The level of IgG 3 production in pollinosis patients was significantly higher than that in normal subjects.  $p < 0.05$ .

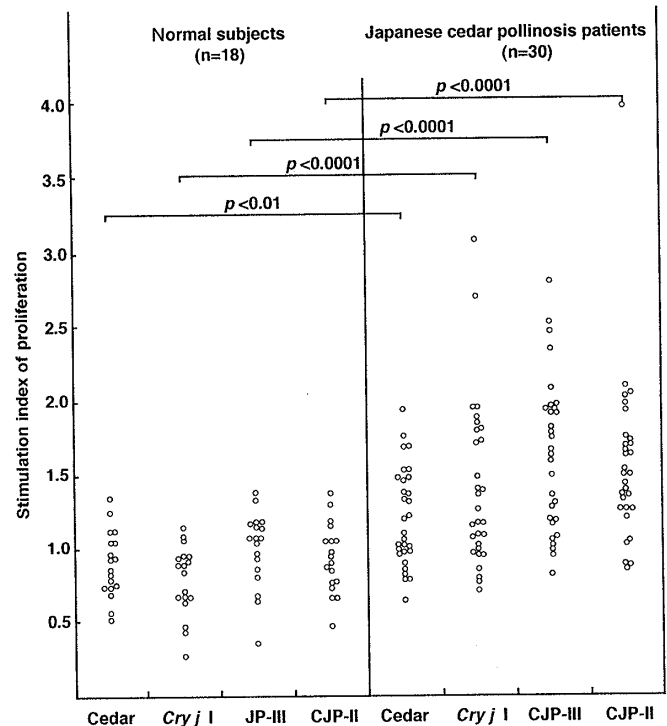


Fig. 4. Lymphocyte proliferative response to Japanese cedar antigens in cultured PBMC from normal subjects and Japanese cedar pollinosis patients.

Data indicate the stimulation indexes of lymphocyte proliferation in each group of four antigens. The level of proliferation in Japanese cedar pollinosis patients was significantly higher than that in normal subjects in cedar ( $p < 0.01$ ), *Cry j I* ( $p < 0.0001$ ), CJP-III ( $p < 0.0001$ ), and CJP-II ( $p < 0.0001$ ) group.

PWM 刺激による増殖反応は、正常者群、スギ花粉症患者群共に旺盛で、Con A による反応ではスギ花粉症患者群の増殖反応は正常者群のそれより有意に高い値を示した。anti-CD40mAb 刺激は Con A, PWM 刺激に比べて増殖反応は著しくなかったが、スギ花粉症患者群の反応は正常者群のそれより有意に高い値を示した。

2. anti-CD40mAb 刺激による末梢血リンパ球の免疫グロブリン産生反応について

anti-CD40mAb 刺激による末梢血リンパ球の IgE, IgG, IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4 産生反応の成績を Fig. 3 に示した。各免疫グロブリンクラス並びにサブクラスを比較すると、IgG 2 産生反応が正常者群、スギ花粉症患者群共に最も顕著にみられた。IgG 3 産生反応では、スギ花粉症患者群の産生反応は正常者群のそれより有意に高い値を示した。IgG 4 産生反応は、正常者群、スギ花粉症患者群共に低く、また、各症例による反応のばらつきもせまい範囲に限られてみられ

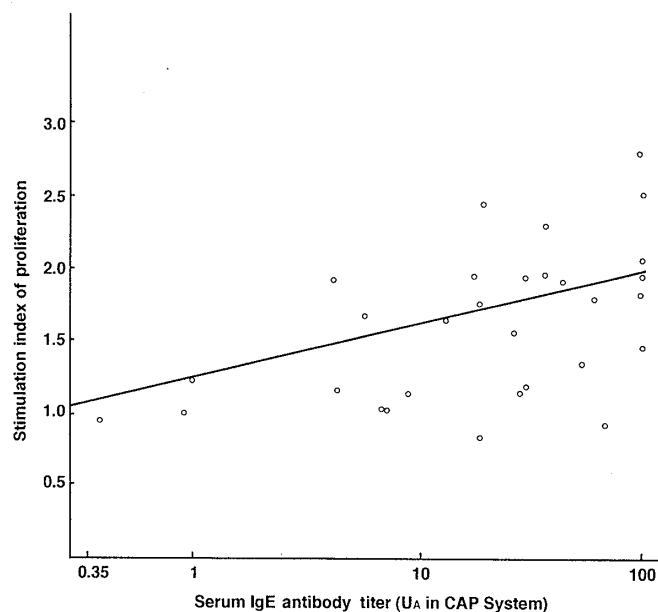


Fig. 5. Correlation between the proliferation in cultured PBMC from Japanese cedar pollinosis patients ( $n=30$ ) stimulated with CJP-III and the serum IgE antibody titer of same patients.

The correlation was observed ( $r=0.504, p<0.005$ ).

た。

### 3. スギ花粉抗原刺激による末梢血リンパ球の増殖反応について

スギ花粉抗原刺激による正常者群並びにスギ花粉症患者群の末梢血リンパ球増殖反応の成績を Fig. 4 に示した。スギ花粉粗抗原, *Cry j* I, CJP-III, CJP-II による刺激全てにおいて、スギ花粉症患者群の反応性は正常群のそれより有意に高く、特に *Cry j* I, CJP-III, CJP-II による刺激では、著しく高い反応例も認められた。この増殖反応はリンパ球を抗 CD 3 モノクローナル抗体と補体で処理すると減弱することから、T 細胞によるものと考えられた(結果非表示)。次に、スギ花粉症患者群について、血清中抗スギ IgE 抗体価とスギ花粉抗原刺激による同一患者の末梢血リンパ球増殖反応の相関を検討してみた。全てのスギ花粉抗原刺激において、血清中抗スギ IgE 抗体価と末梢血リンパ球増殖反応の間に比較的良好な相関が認められたが、Fig. 5 に示す通り、CJP-III 刺激による反応で最も良好な相関 ( $r=0.504, p<0.005$ ) が認められた。

### 4. スギ花粉抗原刺激による末梢血リンパ球の IgE 産生反応について

スギ花粉抗原でリンパ球を刺激した際、スギ花粉特異的抗体産生は検出されなかった。したがって、以下

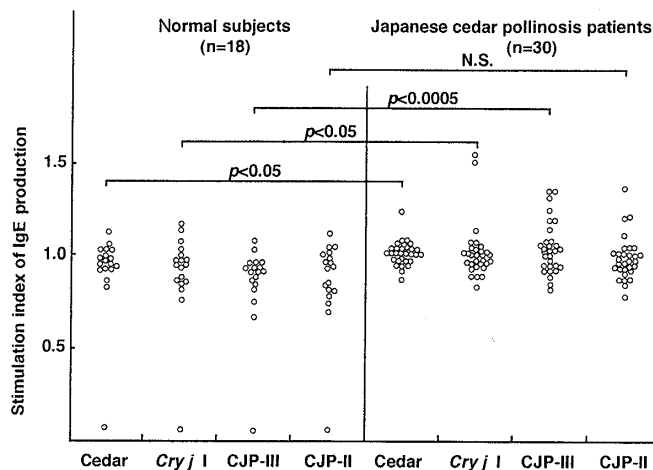


Fig. 6. IgE production in cultured PBMC from normal subjects and Japanese cedar pollinosis patients stimulated with Japanese cedar antigens.

Data indicate the stimulation indexes of IgE production in each group of four antigens. The level of IgE production in Japanese cedar pollinosis patients was significantly higher than that in normal subjects in cedar ( $p<0.05$ ), *Cry j* I ( $p<0.05$ ) and CJP-III ( $p<0.0005$ ) group, but not in CJP-II group. (N.S. means no significant difference.)

の実験では総免疫グロブリン量について検討を行った。スギ花粉抗原刺激による正常者群並びにスギ花粉症患者群の末梢血リンパ球 IgE 産生反応の成績を Fig. 6 に示した。スギ花粉粗抗原, *Cry j* I, CJP-III による刺激では、スギ花粉症患者群の反応性は正常者群のそれより有意に高かった。特に *Cry j* I と CJP-III による刺激では、かなり高い反応例もみられ、反応のばらつきも大きく反応差が観察された。そこで、スギ花粉症患者群について、血清中抗スギ IgE 抗体価とスギ花粉抗原刺激による同一患者の末梢血リンパ球 IgE 産生反応の相関を検討してみた。

全ての花粉抗原刺激において、血清中抗スギ IgE 抗体価と末梢血リンパ球 IgE 産生反応の間に弱い相関が認められ、その 1 例として Fig. 7 に *Cry j* I 刺激による反応での相関 ( $r=0.369, p<0.05$ ) を図示してみた。しかし、IgE 産生反応と増殖反応の相関性を検討してみたところ、両者の間に明らかな相関は認められなかった。

### 5. スギ花粉抗原刺激による末梢血リンパ球の IgG 産生反応について

スギ花粉抗原刺激による正常者群並びにスギ花粉症患者群の末梢血リンパ球 IgG 産生反応の成績を Fig. 8

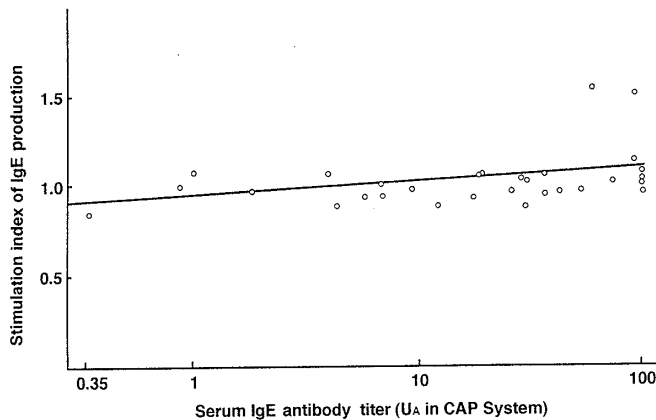


Fig. 7. Correlation between the IgE production in cultured PBMC from Japanese cedar pollinosis patients ( $n=30$ ) stimulated with *Cry j* I and the serum IgE antibody titer of same patients.

The correlation was observed ( $r=0.369$ ,  $p<0.05$ ).

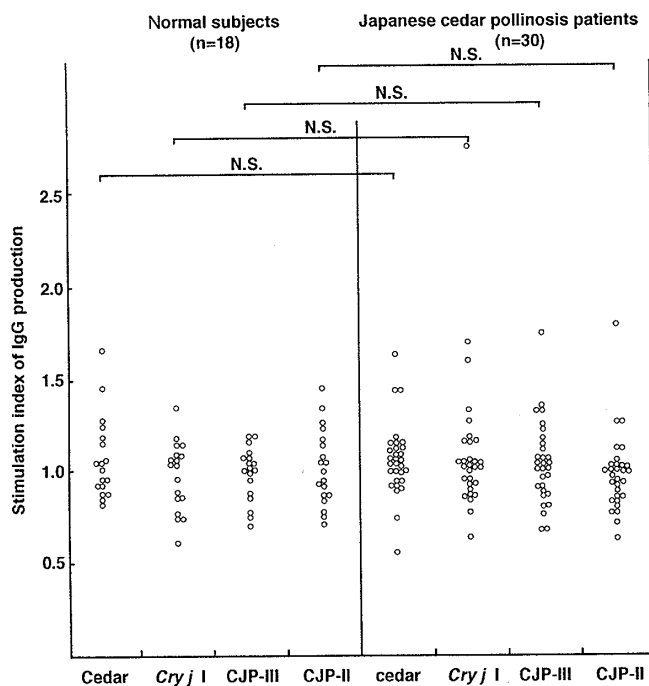


Fig. 8. IgG production in cultured PBMC from normal subjects and Japanese cedar pollinosis patients stimulated with Japanese cedar antigens.

Data indicate stimulation indexes of IgG production in each group of four antigens. A statistically significant difference ( $p<0.05$ ) in the level of IgG production was not found to exist between normal subjects and Japanese cedar pollinosis patients in each group of four antigens. (N.S. means no significant difference.)

に示した。IgG 産生反応については、図に示された通り、正常者群、スギ花粉症患者群共にやや高い反応を

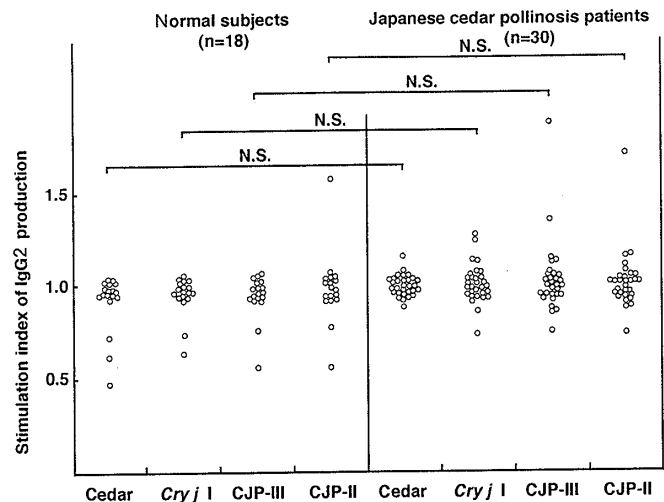


Fig. 9. IgG 2 production in cultured PBMC from normal subjects and Japanese cedar pollinosis patients stimulated with Japanese cedar antigens.

Data indicate the stimulation indexes of IgG 2 production in each group of four antigens. A statistically significant difference ( $p<0.05$ ) in the level of IgG 2 production was not found to exist between normal subjects and Japanese cedar pollinosis patients in each group of four antigens. (N.S. means no significant difference.)

示し (SI 1 以上)、スギ花粉粗抗原、*Cry j* I、CJP-III、CJP-II 刺激全てにおいて正常者群とスギ花粉症患者群の間に反応性の有意差は認められなかった。したがって、スギ花粉症患者群における血清中抗スギ IgE 抗体価とスギ花粉抗原刺激による同一患者の末梢血リンパ球 IgG 産生反応の間には、全く相関が認められなかった。更に、スギ花粉症患者群について、末梢血リンパ球 IgG 産生反応と末梢血リンパ球増殖反応あるいは IgE 産生反応との相関性についても検討してみたが、全て相関は認められなかった。しかし、IgG 産生反応では、スギ花粉粗抗原刺激による反応でも若干高い反応を示した例もみられ注目された。

#### 6. スギ花粉抗原刺激による末梢血リンパ球の IgG サブクラス反応について

スギ花粉抗原刺激による正常者群並びにスギ花粉症患者群の末梢血リンパ球 IgG 1、IgG 2、IgG 3、IgG 4 産生反応の成績を検討してみた。IgG 1 産生反応と IgG 3 産生反応については、各スギ花粉抗原刺激において、反応は全て低く、また、正常者群とスギ花粉症患者群との間にも有意な反応差を全く認めなかった。Fig. 9 にスギ花粉抗原刺激による正常者群並びにスギ花粉症患者群の末梢血リンパ球 IgG 2 産生反応の成績を図示

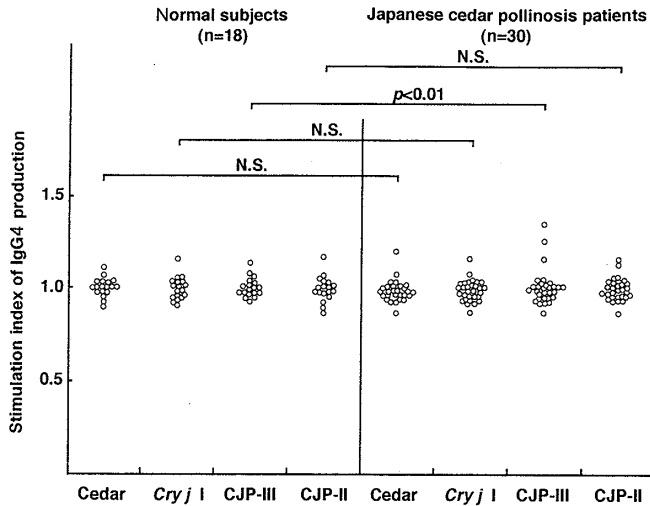


Fig. 10. IgG 4 production in cultured PBMC from normal subjects and Japanese cedar pollinosis patients stimulated with Japanese cedar antigens.

Data indicate the stimulation indexes of IgG 4 production in each group of four antigens. The level of IgG 4 production in Japanese cedar pollinosis patients was significantly higher than that in normal subjects in CJP-III ( $p < 0.01$ ) group, but not in cedar, *Cry j* I and CJP-II group. (N.S. means no significant difference.)

した。図に示された通り、正常者群とスギ花粉症患者群の間に各スギ花粉抗原刺激において有意な反応差は認められなかった。しかし、正常者群における CJP-II 刺激、スギ花粉症患者群における CJP-III 並びに CJP-II 刺激においてかなり高い反応もみられたことが注目された。Fig. 10 に、スギ花粉抗原刺激による正常者群並びにスギ花粉症患者群の末梢血リンパ球 IgG 4 産生反応の成績を図示した。各スギ花粉抗原刺激における反応は著しくなかったが、スギ花粉症患者群での CJP-III 刺激ではやや高い反応例も認められ、正常者群との間に有意差 ( $p < 0.01$ ) が認められた。しかし、スギ花粉症患者群における血清中抗スギ IgE 抗体価と CJP-III 刺激による同一患者の末梢血リンパ球 IgG 4 産生反応の間には、明らかな相関は認められなかった。

正常者群とスギ花粉症患者群にみられた末梢血リンパ球の IgG 産生反応の高値がどの IgG サブクラスの反応に主としてよっているかを検討してみたが、両群共に各スギ抗原刺激において特定の IgG サブクラス産生反応と明らかな相関を示した IgG 産生反応を観察できなかった。

そこで、末梢血リンパ球の IgG サブクラス産生反応で比較的高い反応が認められた IgG 2 産生反応と IgG

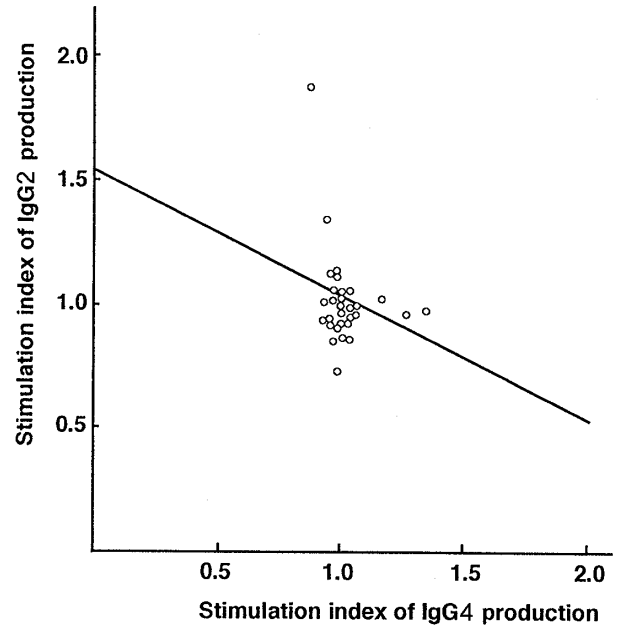


Fig. 11. Correlation between the IgG 2 production and the IgG 4 production in cultured PBMC from Japanese cedar pollinosis patients ( $n = 30$ ) stimulated with CJP-III.

The weak negative correlation ( $r = -0.239$ , not statistically significant) was observed.

4 産生反応について、両者の関係を検討してみた。Fig. 11 に、スギ花粉症患者群における CJP-III 刺激による末梢血リンパ球の IgG 2 産生反応と IgG 4 産生反応の相関を図示してみた。統計学的には有意とされなかったが、両反応の間に弱い負の相関傾向が認められた。

更に、末梢血リンパ球の IgG 2 産生反応や IgG 4 産生反応と IgE 産生反応の関係についても検討を加えてみた。IgG 2 産生反応と IgE 産生反応の間には、今回の成績からは相関を明らかにすることはできなかったが、IgG 4 産生反応と IgE 産生反応の間には、Fig. 12 に図示した通り、統計学的には有意とされなかったが、両反応の間に弱い負の相関傾向が認められた。

## 考 察

今回の末梢血リンパ球培養実験に当たり、スギ花粉抗原刺激による反応を検討する前に、先ず、細胞培養系の成否を確認するため、並びに、mitogen による刺激で何か特徴ある免疫グロブリン産生パターンを得ることはできないかを検討するため、Con A, PWM, anti-CD40mAb などによる末梢血リンパ球の刺激実験を試

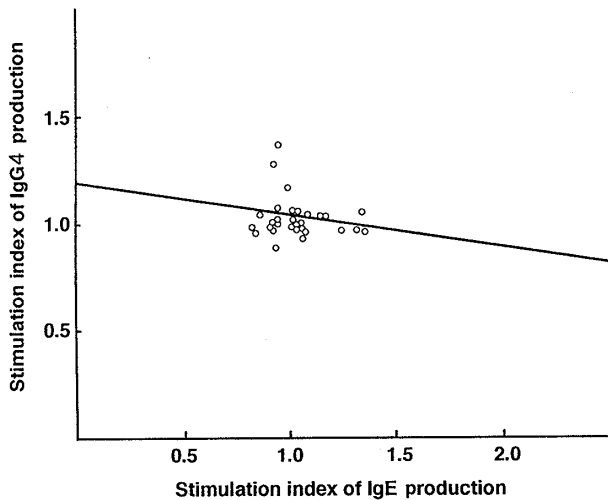


Fig. 12. Correlation between the IgG 4 production and the IgE production in cultured PBMC from Japanese cedar pollinosis patients (n=30) stimulated with CJP-III.

The weak negative correlation ( $r = -0.211$ , not statistically significant) was observed.

みた。Con A と PWM による刺激で共に著しい増殖反応がみられ、Con A による増殖反応では、スギ花粉症患者群のそれは正常者群のそれより有意に高い反応を示し、スギ花粉症患者では花粉非飛散期にあってもメモリー機構によって T 細胞の機能は亢進していると考えられた。anti-CD40mAb 刺激による増殖反応では、反応は比較的低いながら、活性化状態にあると思われるスギ花粉症患者群の B 細胞の反応が有意に高くみられたことも興味ある結果と思われた。また、anti-CD40mAb 刺激による末梢血リンパ球の免疫グロブリン産生反応の成績では、IgG 2 産生反応が正常者群、スギ花粉症患者群の両群において最も高い反応を示した。文献的には、anti-CD40mAb と IL-4 の刺激によって IgE と IgG 4 の産生<sup>5)7)</sup>が誘導され、IgG 2 産生<sup>8)</sup>は誘導されないとの知見が多く、また、IFN- $\gamma$ によって IgG 2 の産生が誘導されるとする報告<sup>9)</sup>もある。今回得られた成績は、anti-CD40mAb 単独刺激の結果であるが、私共が最も期待した IgG 4 産生反応も、当然著しいと推測された IgE 産生反応も、共に反応性は低く興味ある知見を得ることはできなかった。また、anti-CD40mAb と IL-4 を加えた実験も行ったが、anti-CD40mAb 単独の場合と比べて、ほとんど大きな差は認められなかった (結果非表示)。

スギ花粉抗原刺激による末梢血リンパ球培養の研究では、今井らの増殖反応をみた報告<sup>10)</sup>や、本多らの IgG

産生反応を検索した研究<sup>11)</sup>、スギ花粉抗原エピトープの分析で T 細胞クローンを用いる方法<sup>12)</sup>などが挙げられる。今回私共の行った PBMC 培養実験では、スギ花粉抗原として、スギ花粉粗抗原、Cry j I、Cry j I と Cry j II を含む CJP-III 画分、Cry j I も Cry j II も含まない CJP-II 画分の 4 種類の抗原を使用してみた。まず、増殖反応についての成績をまとめると、正常者群では各スギ花粉抗原刺激による反応は全て低く、橋口<sup>13)14)</sup>らの成績で、Cry j I あるいは Cry j II 刺激による T 細胞の増殖反応は無症状者でも強い反応がみられる例があり、増殖反応で花粉症の診断を下すことはできないとした記述と異なる結果であった。スギ花粉症患者群の増殖反応は各スギ花粉抗原刺激全てにおいて著しく、特に Cry j I と CJP-III において強い反応を示し、Cry j I も Cry j II も含まない CJP-II においてもかなり強い反応がみられ注目された。

Cry j I も Cry j II も含まない CJP-II によって増殖反応がみられたことは、CJP-II に非特異的 mitogen 活性があるのか、CJP-II も Cry j I や Cry j II と同じ T 細胞エピトープを持っているのか、minor アレルゲンとして別のエピトープに反応したのか、などの問題を示すものと思われる。しかし、正常者群における CJP-II 刺激による増殖反応はスギ花粉症患者群に比し著しく低値であり、mitogen 活性があったとは考え難く、著者らは、CJP-II に Cry j I や Cry j II と同様のエピトープか別の minor アレルゲンエピトープが含まれているものと解釈しており、それを示唆する成績も報告<sup>15)16)</sup>されている。正常者群とスギ花粉症患者群の間に著しい反応差がみられたことから、スギ花粉症患者群にあってはスギ花粉抗原感作度と末梢血リンパ球増殖反応の間に相関があるのではないかと考えられ、血清中抗スギ IgE 抗体価と末梢血リンパ球増殖反応の関係を検討したところ、両者の間に統計学的に有意の相関が認められ、感作度と増殖反応の関係が明らかとなった。IgE 産生反応についての成績をまとめると、正常者群では各スギ花粉抗原刺激全てにおいて反応性は低かったが、スギ花粉症患者群では正常者群に比しやや高い反応性が認められ、スギ花粉粗抗原、Cry j I、CJP-III の刺激において統計学的に有意の反応差が認められた。また、Cry j I、CJP-III、CJP-II の刺激においては、スギ花粉症患者群で正常者群での最高反応値をはるかに越える反応値を示す例がかなり観察され、反応の個体差を示すものと思われた。また、Cry j I も Cry j II も含まない CJP-II 刺激によっても、少数ではあるがやや高

い反応例がみられたことは、前述の CJP-II による増殖反応の結果と合わせ、CJP-II に B 細胞エピトープが含まれていることを示唆する成績と思われた。IgE 産生反応で正常者群とスギ花粉症患者群の間に反応差が認められたので、スギ花粉症患者群についてはスギ花粉抗原感作度と末梢血リンパ球 IgE 産生反応の関係が注目され、血清中抗スギ IgE 抗体価と末梢血リンパ球 IgE 産生反応の間の相関を検討したところ、両者の間に弱い相関が認められた。しかし、IgE 産生反応と増殖反応の間には明らかな相関は認められなかった。IgG 産生反応についての成績をまとめると、各スギ花粉抗原刺激により正常者群、スギ花粉症患者群共にやや高い反応が認められ、正常者群とスギ花粉症患者群の間に統計学的に有意な反応差は認められなかった。したがって、スギ花粉症患者群における血清中抗スギ IgE 抗体価と末梢血リンパ球 IgG 産生反応の間には相関は認められなかった。また、IgG 産生反応と増殖反応、IgG 産生反応と IgE 産生反応との間などにも相関は認められなかった。IgG 産生反応においては、スギ花粉粗抗原刺激による反応でも若干高い反応例もみられ、IgE 産生反応や IgG サブクラス産生反応ではスギ花粉粗抗原刺激による反応は全て極めて低値を示すなかで、注目される結果と思われた。IgG サブクラス産生反応についての成績をまとめると、比較的高い反応性を示したのは IgG 2 産生反応と IgG 4 産生反応であり、IgG 1 産生反応と IgG 3 産生反応は各スギ花粉抗原刺激において全て低い反応しか示さなかった。IgG 産生反応において、正常者群とスギ花粉症患者群共にみられた高値が、どの IgG サブクラスに主としてよっているかを検討してみたが、主役としての IgG サブクラスを断定することができなかった。IgG 2 産生反応では、正常者群とスギ花粉症患者群の間に反応の有意差を認めなかったが、IgG 4 産生反応では、CJP-III 刺激で統計学的に有意な反応差が認められた。そこで、スギ花粉症患者群におけるスギ花粉抗原感作度と *in vitro* 末梢血リンパ球 IgG 4 産生反応の関係が注目されたが、血清中抗スギ IgE 抗体価と末梢血リンパ球 IgG 4 産生反応の間には明らかな相関は証明されず、免疫治療の臨床観察で患者血清中抗スギ IgE 抗体価が高値である程治療による IgG 4 抗体価上昇が著しい傾向がみられるとの成績<sup>1)</sup>を裏付けることはできなかった。更に、今回試みた *in vitro* IgG 4 産生反応やそれに連鎖する他の反応などの特徴を検討してみたが、各反応共に反応度や個体差が不十分であり、臨床的免疫治療における

IgG 4 抗体高度反応例すなわち IgG 4 high responder を免疫治療前に予知選別する方法としては全く不備にて創意や改良が必要と思われた。

前述したように、IgG 2 は Th 1 細胞より産生される IFN- $\gamma$  によって誘導<sup>9)</sup>され、IgE と IgG 4 は Th 2 細胞より産生される IL-4 によって誘導<sup>5)6)</sup>されるとされていることから、末梢血リンパ球の IgG 2 産生反応と IgG 4 産生反応の関係を検討することは興味ある問題と思われた。今回の成績では、スギ花粉症患者群における末梢血リンパ球の IgG 2 産生反応と IgG 4 産生反応の間には、統計学的には有意とされなかったが弱い負の相関傾向が示され、Th 1 細胞優位の反応と Th 2 細胞優位の反応が拮抗して出現しているかの現象と思われた。同様の観点から、末梢血リンパ球の IgG 2 産生反応と IgE 産生反応の関係についても検討を加えてみたが、今回の成績からは両反応の間に相関を明らかにすることはできなかった。

先にも触れた免疫治療の臨床観察における患者血清中抗スギ IgE 抗体価高値例に治療による IgG 4 high responder が多いとの成績は、自然感作による主として nasopharyngeal associated lymphoid tissue (NALT) における IgE 抗体産生と経皮感作による主として腋窩リンパ節における IgG 4 抗体産生を論じていることになる。そこで、末梢血リンパ球培養による *in vitro* ではあるが同一条件下での B 細胞による IgG 4 産生反応と IgE 産生反応の関係を検討することも必要と思われた。今回の成績を検討した結果では予測に反し、統計学的には有意と判定されなかったとはいえ、IgE 産生反応と IgG 4 産生反応の間に弱い負の相関傾向が示された。ヒト B 細胞における IL-4 による IgE と IgG 4 へのクラススイッチについては、Gascan<sup>6)</sup>ら、Lundgren<sup>5)</sup>らの報告に詳しいが、Jabara<sup>17)</sup>らの研究によると、switch fragment の分析により S $\mu$ /S $\epsilon$  junction に S $\gamma$  4 由来の塩基挿入がみられることを指摘し、B 細胞では IgM から先ず IgG 4 へスイッチし、次いで S $\gamma$  4 由来の sequence を再度 loop out することによって IgE へスイッチすると述べている。しかし、彼らは IgG 4 から IgE へクラススイッチさせる trigger については言及していない。彼らの知見により考察すると、B 細胞の IgG 4 産生反応と IgE 産生反応は相反する反応として進行するわけで、今回の研究でスギ花粉症患者群における末梢血リンパ球の IgG 4 産生反応と IgE 産生反応の間に負の相関傾向が示されたことは、彼らの説に適うものと考えられた。

今回の実験方法に工夫と改良がなされ、反応度や個体差の有意に大きい *in vitro* リンパ球反応系を得ることができれば、IgG 2 産生反応と IgG 4 産生反応の関係から、IgG 2 産生反応が著明であれば、IgG 4 low responder ではあるが Th 1 細胞優位性であるなどの予測や、IgE 産生反応と IgG 4 産生反応の関係からは、IgG 4 産生反応が著明であれば、臨床的に免疫治療を行った場合 IgE 抗体感作を増悪させることなく IgG 4 抗体を増加させる可能性を予測することができるかもしれない。

稿を終えるに際し、本研究のために *Cry j* I を提供して下さいた林原生物化学研究所の栗本雅司先生、谷口美文先生に深謝致します。

# 文 献

- 1) 林 鷹治, 林 賢: スギ花粉症における自然感作並びに免疫治療による血清 IgE, IgG, IgG<sub>4</sub> その他 IgG サブクラス抗体反応について. アレルギー科 **5**, 429-450, 1998.
- 2) Harrison, M.R., Thurmond, G.B. and Thomas, G. M.: A simple and versatile harvesting device for processing radioactive label incorporated into and /or released from cells in microculture. *J. Immunol. Methods* **4**, 11-20, 1974.
- 3) Sagawa, K., Ono, K., Oka, S., Jyo, T., Kuroiwa, A. et al.: B cell mitogenic activity of sea squirt antigen. *Inter. Arch. Appl. Immunol.* **104**, 270-276, 1994.
- 4) Zar, J.H.: Biostatistical analysis. Prentice Hall Inc., Eaglewood Cliffs, New Jersey, USA, 1974.
- 5) Lundgren, M., Persson, U., Larsson, P., Magnusson, C., Edvard Smith, C.I., et al.: Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG<sub>4</sub> in human B cells. *Eur. J. Immunol.* **19**, 1311-1315, 1989.
- 6) Gascan, H., Gauchat, J.-F., Aversa, G., Van Vlaselaer, P. and De Vries J.E.: Anti-CD 40 monoclonal antibodies or CD 40<sup>+</sup> T cell clones and IL-4 induce IgG<sub>4</sub> and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. *J. Immunol.* **147**, 8-13, 1991.
- 7) Splawski, J.B., Fu, S.M. and Lipsky, P.E.: Immunoregulatory role of CD 40 in human B cell differentiation. *J. Immunol.* **150**, 1276-1285, 1993.
- 8) Fujieda, S., Zhang, K. and Saxon, A.: IL-4 plus CD 40 monoclonal antibody induces human B cells  $\gamma$  subclass-specific isotype switch: Switching to  $\gamma$  1,  $\gamma$  3, and  $\gamma$  4, but not  $\gamma$  2. *J. Immunol.* **155**, 2318-2328, 1995.
- 9) Kitani, A. and Strober, W.: Regulation of  $\gamma$  subclass germ-line transcripts in human peripheral blood B cells. *J. Immunol.* **151**, 3478-3488, 1993.
- 10) 今井 透, 野原 修, 片山 昇, 遠藤朝彦, 井上 栄, 他: T 細胞応答性を用いた, スギ特異的減感作療法の効果判定. アレルギー **45**, 1172-1180, 1996.
- 11) 本多一至, 牧嶋和見, 笹月武彦: スギ花粉抗原に対する IgG 抗体産生の免疫遺伝学的解析. アレルギー **40**, 423-427, 1991.
- 12) Ikagawa, S., Matsushita, S., Chen, Y., Ishikawa, T. and Nishimura, Y.: Single amino acid substitutions on a Japanese cedar pollen allergen (*Cry j* I) - derived peptide induced alteration in human T cell responses and T cell receptor antagonism. *J. Allergy Clin. Immunol.* **97**, 53-64, 1996.
- 13) Hashiguchi, S., Hino, K., Taniguchi, Y., Kurimoto, M., Fukuda, K., et al.: Immunodominance of seven regions of a major allergen, *Cry j* II, of Japanese cedar pollen for T-cell immunity. *Allergy* **51**, 621-632, 1996.
- 14) 橋口周平, 杉村和久: スギ花粉抗原の分子生物学的解析とエピトープの同定. 日本臨床 **54**, 2233-2242, 1996.
- 15) 安枝 浩, 油井泰雄, 清水章治, 遠藤久子, 信太隆夫: スギ花粉アレルゲンの分析. アレルギー **29**, 763-772, 1980.
- 16) 伊藤由紀子, 吉仲由之, 坂倉康夫: スギ花粉アレルゲンに反応するスギ花粉症患者血清中の IgE, IgG 抗体の検出. 医学のあゆみ **122**, 1183-1140, 1982.
- 17) Jabara, H.H., Loh, R., Ramesh, N., Vercelli, D. and Geha, R.S.: Sequential switching from  $\mu$  to  $\epsilon$  via  $\gamma$  4 in human B cells stimulated with IL-4 and hydrocortisone. *J. Immunol.* **151**, 4528-4533, 1993.

## THE PROLIFERATIVE RESPONSE AND IMMUNOGLOBULIN PRODUCTION IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES STIMULATED WITH JAPANESE CEDAR POLLEN ANTIGENS

Takaharu Hayashi

*Division of Otorhinolaryngology, Takanobashi Chuoh Hospital, Hiroshima*

Ken Hayashi

*Department of Otorhinolaryngology, Hiroshima University School of Medicine*

Toshihiko Jyo

*Division of Internal Medicine, Takanobashi Chuoh Hospital, Hiroshima*

Ryoko Asaoku

*Division of Internal Medicine, Takanobashi Chuoh Hospital, Hiroshima*

Seiko Shigeta and Kazuhisa Ono

*Faculty of Molecular Biotechnology, Hiroshima University*

Uki Yamashita

*Department of Immunology, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyusyu*

Peripheral blood mononuclear cells taken from 38 normal subjects and 50 Japanese cedar pollinosis patients were cultured with or without mitogens or Japanese cedar pollen antigens to study the proliferative response and immunoglobulin production in peripheral blood lymphocytes. When stimulated with Con A or anti-CD 40 mAb, the proliferative responses in the patient group were significantly higher than those in the normal group, and when stimulated with anti-CD40mAb, the IgG 2 production was markedly dominant among the IgE and IgG subclass productions in both groups. When stimulated with Japanese cedar pollen antigens, the proliferative responses in the patient group were markedly augmented in comparison with the normal group, and showed a correlation with the serum anti-cedar IgE antibody titers in the patient group. In regard to the immunoglobulin production in peripheral blood lymphocytes stimulated with Japanese cedar pollen antigens, the IgE productions in the patient group were significantly higher than those in the normal group, and showed a weak correlation with the serum anti-cedar IgE antibody titers in the patient group. The IgG productions were, however, slightly enhanced by the stimulation with Japanese cedar pollen antigens in both of the normal and patient groups. While it could not be clearly demonstrated which subclass of IgG was responsible for the enhancement of IgG production, there were some cases of relatively higher responses of IgG 2 or IgG 4 production. Though the IgG 4 productions in the patient group were significantly higher than those in normal group, there was no clear correlation with the serum anti-cedar IgE antibody titers in the patient group. On the other hand, it seems to be noteworthy that a weak negative correlation was recognized between the IgG 2 productions and the IgG 4 productions, and between the IgG 4 productions and the IgE productions.

Considering these results in the present study, it was concluded to be difficult to identify a IgG 4 high responder in a course of clinical immunotherapy through the *in vitro* IgG 4 production or other related reactions as attempted in this study.