

気管支喘息児リンパ球における IgE 産生の検討

同愛記念病院小児科

向山徳子 伊藤わか 市川邦男

山口公一 馬場 実

埼玉医大小児科

野間 剛

気管支喘息児のリンパ球培養上清中の IgE ならびに *Dermatophagoides farinae* (Df) 特異 IgE 抗体産生につき検討した。

気管支喘息児リンパ球の IgE 産生は培養 1 日目より上昇がみられ 7 日以降にプラトーとなる傾向がみられた。気管支喘息児の無刺激リンパ球培養上清の IgE 値は非アトピー群より高値を示し 0.1~15.0 IU/ml にわたっていた。気管支喘息児 26 例中 5 例に培養上清の Df 特異 IgE 抗体が陽性に出現した。

非アトピー健康小児においては無刺激リンパ球培養上清の IgE は全例測定限界 0.05 IU/ml 以下であり、Df 特異 IgE 抗体も全例陰性であった。

リンパ球 IgE と血清 IgE の間には良好な相関が認められた ($r=0.835$, $p<0.001$)。リンパ球 IgE と Df 特異 IgE 抗体の間にも相関が認められた ($r=0.717$, $p<0.001$)。

気管支喘息児におけるリンパ球培養上清の IgE は非アトピー小児に比し著明に産生亢進が認められた。

気管支喘息児リンパ球に IFN- γ を添加し 5 日間培養したところ IgE 産生の抑制が認められた。Df 刺激リンパ球に IFN- γ を添加し培養したところ、IgE 産生の抑制はさらに著明なものとなった。また、Df 刺激リンパ球 IgE 産生に与える IFN- γ の抑制効果には濃度依存性が認められた。

Key words: bronchial asthma — *Dermatophagoides farinae* — IFN- γ — IgE

緒 言

アトピー性疾患において、IgE は種々のサイトカインの影響を受け、その産生が調節されている。アトピー性疾患患者における IgE 抗体産生の特徴は IgE 抗体が持続的に産生されているという点にある。

奥平ら^{1)~3)}はアトピー性疾患患者における持続的な IgE 抗体産生は、長寿命の抗体産生細胞 long-lived antibody forming cell の働きによるものであるという考え方を提唱した。この長寿命の抗体産生細胞は in vitro において、spontaneous すなわち自律的に IgE

抗体産生を続けることが示されている。

この自律的 IgE 産生能は interleukin 4 (IL-4) により産生が亢進し、interferon- γ (IFN- γ) や⁴⁾neuropeptide により抑制され⁵⁾、かつ宿主の IL-4 遺伝子発現能により規定されることが示された⁶⁾⁷⁾。

今回著者らは気管支喘息児リンパ球培養上清の IgE ならびに Df 特異的 IgE 抗体を測定した。また、リンパ球に IL-4, IFN- γ を添加培養し IgE を測定したので報告する。

対 象

対象は Df (*Dermatophagoides farinae*) に対する IgE RAST スコアが 4 以上のアトピー型の気管支喘息患者 26 例ならびにアトピー性疾患を認めない健康小児 5 例の計 31 例である。気管支喘息患者の内訳は 5 歳以下 4 例、6~15 歳 17 例、緩解例 5 例である。経口抗アレルギー薬、経口副腎皮質ステロイド薬を使用していな

Received: October 12, 1993

Accepted: January 11, 1994

Abbreviations: Df *Dermatophagoides farinae*; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; IL interleukin; IFN interferon; mAb monoclonal antibody; PBS phosphate buffered saline; PBMC peripheral blood mononuclear cell; TNF tumor necrosis factor

い症例につき検討した。

方 法

1) 末梢血単核球の分離

ヘパリン加末梢静脈血を Ficoll-Hypaque (比重 1.077) 液に静かに重層, 250×g 室温にて30分遠心し, 中間層から単核球を分離した。分離単核球を phosphate buffered saline (PBS) にて3回洗浄した。

細胞数を 1×10^6 個/ml に調整し, 10%胎児ウシ血清 (FCS: fetal calf serum), RPMI1640培養液に浮遊した。

5%CO₂培養器にて, アレルゲン無刺激または刺激培養後, 培養上清を 4℃, 350×g 遠心にて分離した。培養上清は IgE 測定まで -80℃ に冷凍保存した。

アレルゲンとしては, Df 10μg/ml にて刺激培養した。培養日数は 1, 3, 5, 7, 10日まで培養した。

なお FCS は56℃30分間非働化したものを用いた。

培養開始時に human recombinant IL-4 (Genzyme) ならびに human leukocyte IFN-γ (JCR Pharmaceutical Co.) を添加し 5日間培養した。また, Df 刺激24時間後に PBS にて3回洗浄し, INF-γ 250U/ml を添加し, さらに4日間培養しその上清を採取した。

2) 培養上清 IgE の測定⁸⁾

培養上清 IgE は 2 ステップサンドイッチ法を利用した全自動 EIA 装置 IMx (ダイナボット) により測定した。

すなわち, 検体中の IgE はまずマイクロパーティクルに固定化された抗 IgE マウスモノクローナル抗体に結合し, 次に反応液をグラスファイバーディスクに通すと, マイクロパーティクルがそこに吸着され血中 IgE の結合型と遊離型の分離が行われる。次いでアルカリフォスファターゼ標識抗 IgE マウスモノクローナル抗体を加えると, 抗 IgE マウスモノクローナル抗体-IgE-アルカリフォスファターゼ標識抗 IgE マウスモノクローナル抗体のサンドイッチ型の結合物を形成する。基質4-メチルウンベリフェリルリン酸を加えその蛍光強度から IgE を測定する。最小検出感度は 0.05IU/ml である。

培養上清 IgE の希釈曲線を Fig. 1 に示す。

3) 培養上清 Df 特異 IgE 抗体

リンパ球培養上清中の Df 特異 IgE 抗体を CAP-RAST 法にて測定した。

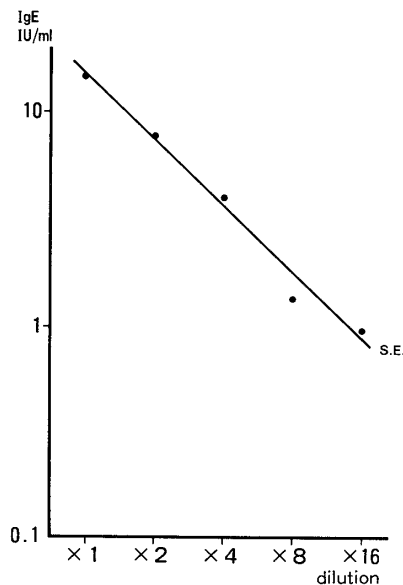


Fig. 1. Dilution curve of IgE by PBMC showed linear curve.

4) 統計処理の方法

IgE の測定下限が0.05IU/ml のため, 0.05IU/ml 以下の値は統計処理上0.05IU/ml として処理した。統計は t 検定を用いた。

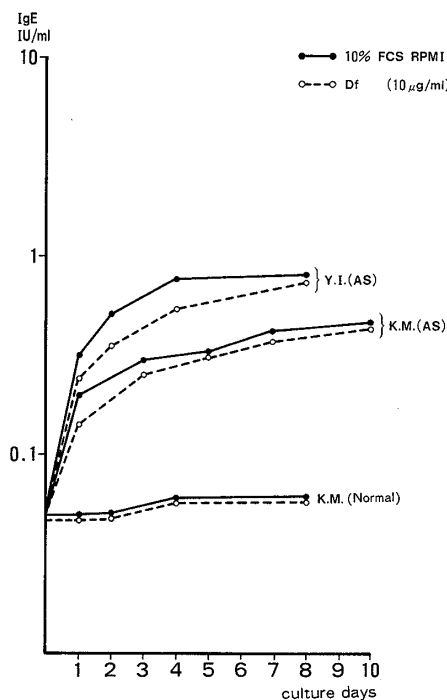


Fig. 2. Spontaneous IgE production by PBMC on each culture days. Asthmatic children (AS) showed higher level of IgE than normal children.

結 果

1) 培養日数による末梢血リンパ球 IgE 産生の変動を Fig. 2 に示す。気管支喘息患者においては、培養 1 日目より IgE の産生が認められ、4～5 日でプラトーとなった。

Df 10 μ g/ml を添加した場合は培養 5 日まで無刺激 IgE 産生より低値を示す傾向にあったが、7～10 日で同等となった。

対照小児においては、無刺激培養、ならびに Df 刺激培養のいずれにおいても 10 日間まで IgE の産生は認められなかった。

このことより、以下のデータは無刺激培養 5 日目の培養上清につき検討を行った。

2) 気管支喘息児末梢血リンパ球における自律的 (spontaneous) IgE 産生 (Fig. 3)

気管支喘息児末梢血リンパ球培養 5 日目における無刺激の自律的 IgE 産生を Fig. 3 に示す。リンパ球 IgE

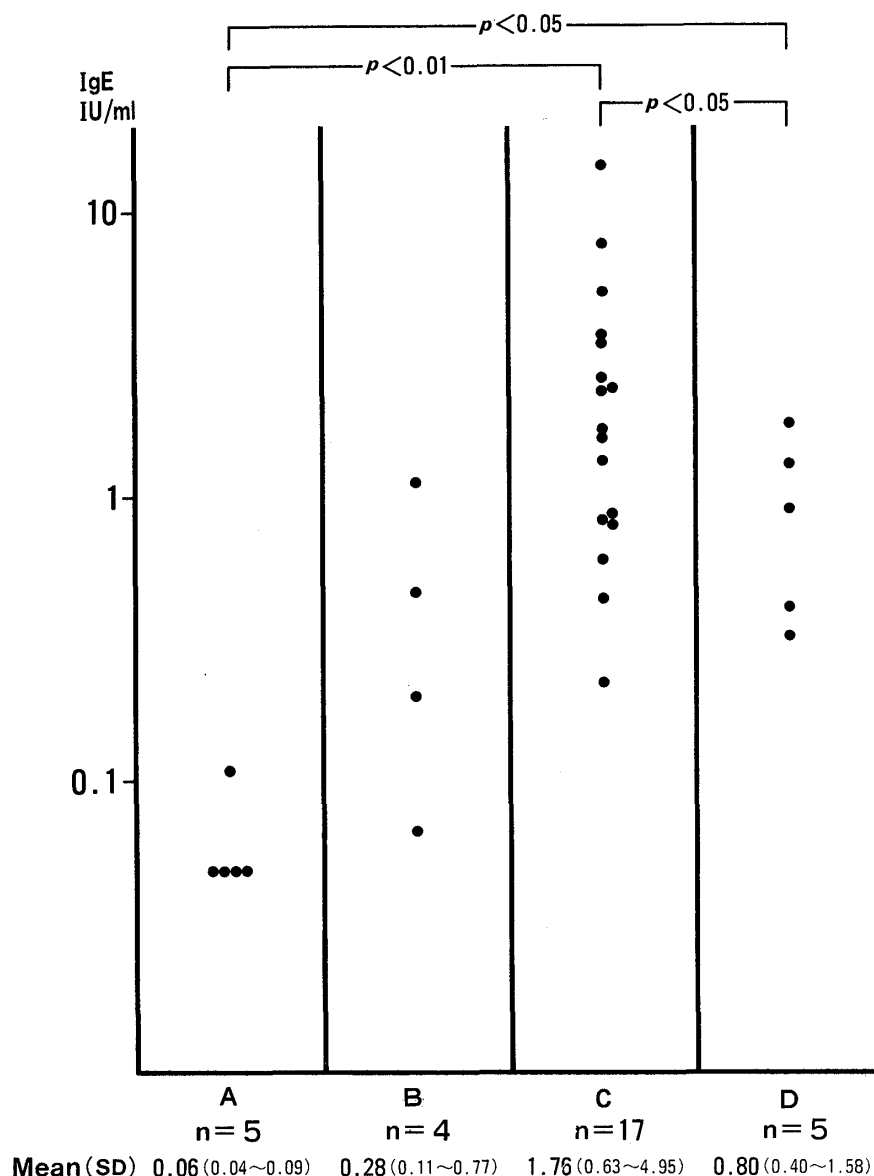


Fig. 3. Spontaneous IgE production by PBMC on 5 culture days in each groups.

A: Normal healthy children, B: Bronchial asthma (under 5 years of age), C: Bronchial asthma (6~15 years of age), D: Remission. IgE production of C group showed highest level.

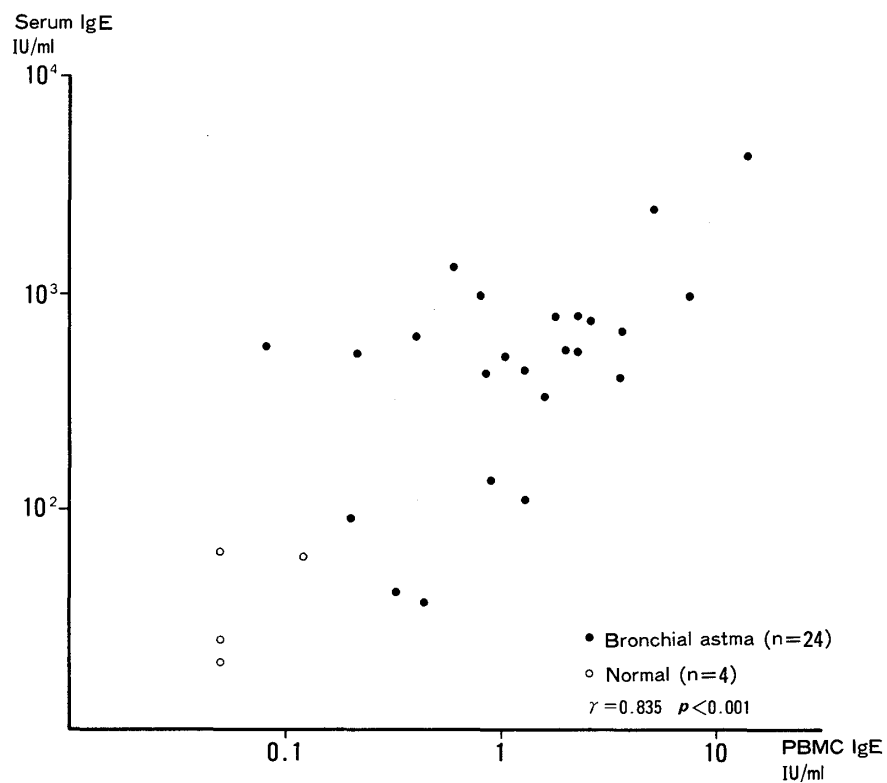


Fig. 4. Serum IgE and PBMC IgE on 5 culture days showed well correlation ($r=0.835$, $p<0.001$).

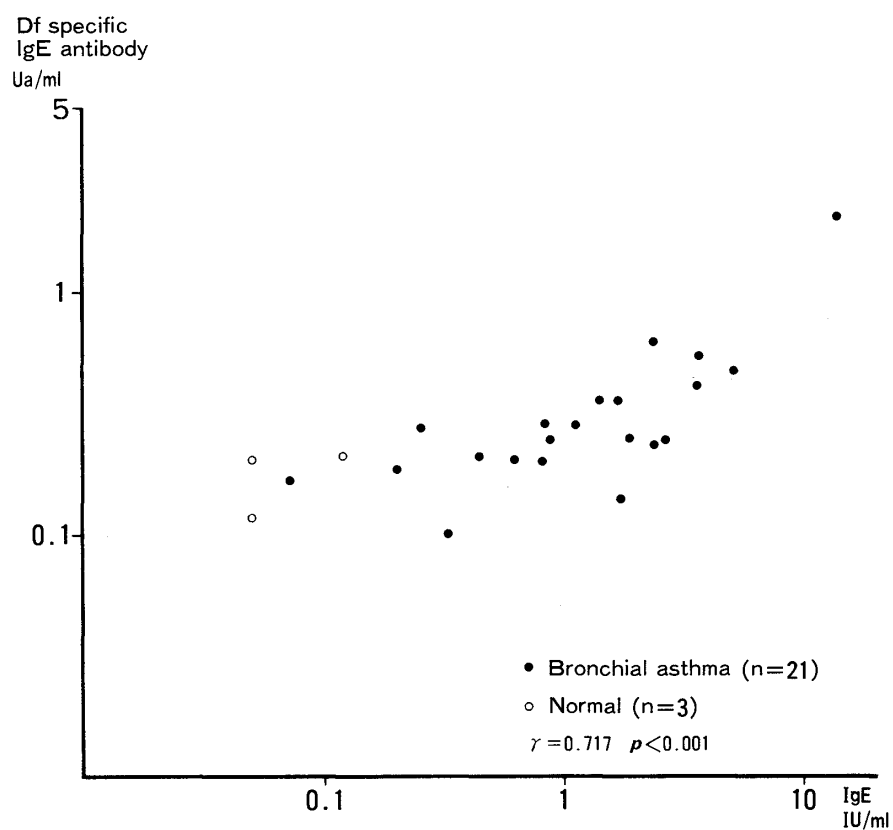


Fig. 5. Spontaneous IgE and Df specific IgE antibody by PBMC on 5 culture days showed well correlation ($r=0.717$, $p<0.001$).

産生は5歳以下で幾何平均0.28IU/ml (SD 0.11~0.77), 6~15歳以下で1.76IU/ml (SD 0.63~4.95), 緩解例で0.80IU/ml (SD 0.40~1.58) と6~15歳で高値を示していた。対照児では5例中4例が0.05IU/mlの測定感度以下であった。

3) 末梢血リンパ球のIgE (培養5日目) と血清IgE (Fig. 4)

培養5日目における末梢血リンパ球のIgEと血清IgEの関係をFig. 4に示す。

培養上清のIgEと血清IgEの間には相関係数 $r=0.835$, $p<0.001$ と良好な相関が認められた。

4) 末梢血リンパ球におけるIgEならびにDf特異IgE抗体 (培養5日目) (Fig. 5)

培養5日目における末梢血リンパ球におけるIgE

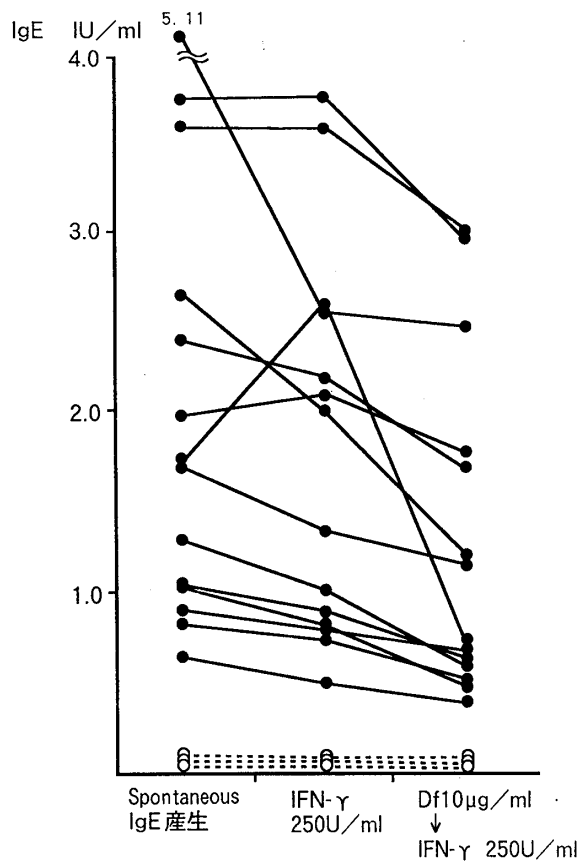


Fig. 6. IgE production in Df stimulated lymphocyte followed by addition of IFN- γ .

●—● Bronchial asthma (n=14), ○—○ Healthy children (n=3). The level of spontaneous IgE production in bronchial asthma showed 1.66 ± 0.32 IU/ml. The level of lymphocyte IgE by addition of IFN- γ showed 1.45 ± 0.24 IU/ml. The level of IgE in Df stimulated lymphocyte followed by addition of IFN- γ showed 1.07 ± 0.22 IU/ml.

ならびにDf特異IgE抗体の関係をFig. 5に示す。培養上清のIgEとDf特異IgE抗体の間には相関係数 $r=0.717$, $p<0.001$ と良好な相関が認められた。

5) 末梢血リンパ球IgE産生に与えるIL-4の効果

末梢血リンパ球を 1×10^6 個/mlに調整し、IL-4を100, 200, 500U/ml添加し5日間培養し、上清中のIgEを測定した。データは示さないが気管支喘息児ならびに健康小児のいずれにおいてもIL-4非添加群に比し有意な変動はみられなかった。

6) 末梢血リンパ球IgE産生に与えるIFN- γ の効果

末梢血リンパ球にIFN- γ を250U/ml添加し5日間培養し、上清中のIgEを測定した。IFN- γ 非添加時のIgEは 1.66 ± 0.32 IU/mlであり、一方IFN- γ を添加した場合のIgEは 1.45 ± 0.27 IU/mlと軽度の低下がみられた。

リンパ球をDf $10 \mu\text{g/ml}$ にて刺激し、24時間後にPBSにて3回洗浄後IFN- γ を250U/ml添加しさらに4日間培養した。その培養上清のIgEは 1.07 ± 0.22 IU/mlと非添加群に比し有意に低値であった ($p<0.01$) (Fig. 6)。

また、Df刺激リンパ球IgE産生に与えるIFN- γ の効果は濃度依存性が認められた (Fig. 7)。

7) Df刺激リンパ球IgE産生におけるanti IFN- γ

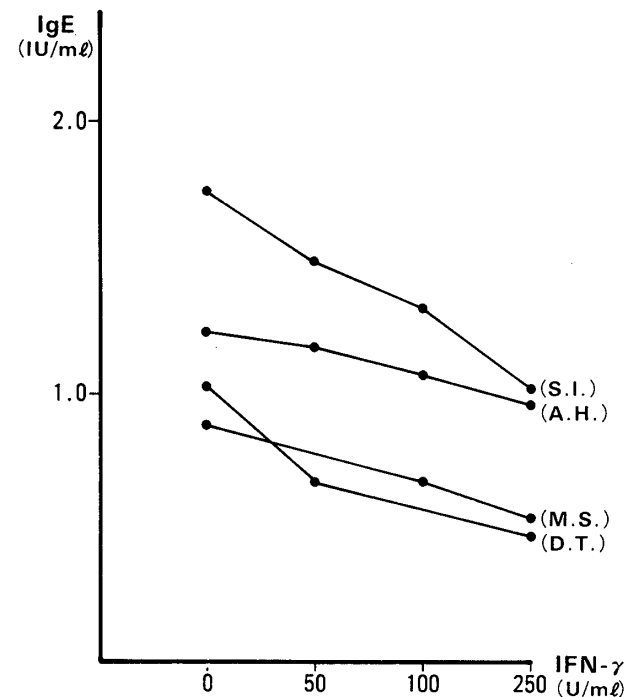


Fig. 7. The level of IgE in Df stimulated lymphocyte followed by addition of IFN- γ decreased by concentration of IFN- γ .

Table 1 Anti IFN- γ mAb neutralizes inhibitory effect of IgE production by Df stimulated PBMC

Culture conditions	Anti IFN- γ mAb	IgE production(IU/ml)		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3
Medium	(-)	0.53	0.40	0.37
Df+IFN- γ	(-)	0.40	0.25	0.20
Df+IFN- γ	(+)	0.54	0.34	0.39

mAb の効果

末梢血リンパ球に anti IFN- γ mAb (Hayashibara) 10 μ l/ml 添加し 4℃にて30分間静置した。その後 Df 10 μ g/ml と IFN- γ 250U/ml を添加し 5 日間培養し IgE を測定した。Table 1 に示すごとく Df 刺激リンパ球における IgE 産生の抑制は anti IFN- γ mAb の前処置により阻止された。

考 察

アトピー性疾患患者においては IgE 抗体産生の亢進が認められる。免疫グロブリン産生および免疫グロブリンクラス変換は種々のサイトカインによって調節されていることが明らかになってきた。

マウスにおいては CD4⁺ T 細胞クローンはその産生するサイトカインの産生能の相違によって Th1 と Th2 の 2 つのサブセットに分類されている⁹⁾。Th1 細胞は主にインターロイキン 2 (interleukin-2, IL-2), インターフェロン γ (interferon- γ , IFN- γ), および β 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF- β) を産生する。これに対して Th2 細胞は主に IL-4, IL-5, IL-6 および IL-10 を産生する。IL-3 や GM-CSF はいずれの細胞からも産生される。Th2 細胞から産生される IL-4 は IgE 抗体産生を誘導するが, Th1 細胞から産生される IFN- γ は IgE 抗体産生を抑制する。Th1 と Th2 はそれぞれ異なったサイトカインを介してお互いに拮抗的に作用していると考えられる。ヒトにおける T 細胞サブセットに関しても同様に IL-4 により IgE 産生が亢進し, IFN- γ により抑制されるという報告がみられる¹⁰⁾。

成熟 B リンパ球は増殖, 分化し抗体産生細胞にまで成熟, 分化するが, IL-4 による IgE 抗体産生においては, それぞれに先立って B 細胞における FC ϵ RII の発現誘導が認められる。FC ϵ RII は B 細胞増殖因子であ

る可能性が示唆されている¹¹⁾。

B 細胞の大部分はアポトーシスで死滅していくが, soluble FC ϵ RII (25KDa) と IL-1 α の添加により死滅をまぬがれ抗体産生細胞へ分化しうることが報告されている¹²⁾。

ある種の抗 FC ϵ RII 抗体は IL-4 による IgE 産生の誘導がアトピー性疾患患者 B 細胞による自律的な IgE 産生を抑制することが知られている¹⁰⁾¹³⁾。Delespesse ら¹⁴⁾は soluble FC ϵ RII の 37KDa 分子に, また Chrétien ら¹⁵⁾は 33KDa 分子に, 末次らは 29KDa 分子に IL-4 による IgE 産生増強活性があることを報告している。IL-4 による IgE 抗体産生の誘導の一部は soluble FC ϵ RII を介している可能性が示されている。

アトピー性疾患患者における CD20⁺ B 細胞上の CD23 および IL-4 レセプターは自発的に発現が亢進していることが示されている¹⁶⁾。アトピー性皮膚炎患者の PBMC は生体内で既に IL-4 レセプターを過剰に発現しており, IL-4 刺激によっても IL-4 レセプターの発現増強作用はほとんど認められないことが示されている。このようなアトピー性疾患患者の生体内における CD23 や IL-4 レセプターの発現増強には, 内因性の IL-4 の過剰産生が関与しているものと考えられる。

CD23 は IL-4 依存的に活性化された B 細胞や単球に発現誘導される活性化マーカーである。CD23 には FC ϵ RIIa と FC ϵ RIIb という細胞内ドメインの一部のアミノ酸配列のみが異なった 2 種類のサブタイプがある¹⁷⁾。

FC ϵ RIIb の発現は IL-4 依存的であり, アトピー性疾患患者の PBMC 中には FC ϵ RIIb mRNA が検出される¹⁸⁾。

IL-4 による IgE 抗体産生の誘導には T/B cognate interaction の促進が必須であるが, 最近 B 細胞抗原の 1 つである CD40 が IL-4 によって発現が増強され, さらに CD40 の架橋を介して IgE クラススイッチが誘導されるという新しい経路も見いだされている¹⁹⁾。

一方 IgE 産生は IFN- γ により抑制されることが認められている¹⁰⁾²⁰⁾。しかし, IgE 産生における IFN- γ の抑制効果の機序に関しては不明な点が多い。今回著者らの成績において, Df 刺激リンパ球に IFN- γ を添加することにより IgE 産生は抑制されしかもその抑制は, anti IFN- γ mAb により阻止された。抗原刺激により活性化された細胞が IFN- γ の添加によりさらに IgE 産生機能の抑制効果を発揮したものと考えられる。Cardell ら²¹⁾は抗原で一次刺激をした CD4⁺細胞

にさらに IFN- γ で二次的に刺激を加えると IFN- γ の産生が増強されることを報告している。IgE 産生抑制機序と考え合わせると興味ある知見と思われる。

まとめ

気管支喘息児リンパ球の IgE 産生は培養 1 日目より上昇がみられ、7 日以降にプラトーとなる傾向がみられた。一方、非アトピー健康小児においてはリンパ球の IgE 産生は認められなかった。

リンパ球 IgE と血清 IgE の間には良好な相関が認められた。

気管支喘息児リンパ球は自律的 IgE 産生の亢進が認められた。Df 刺激リンパ球の IgE 産生は IFN- γ の添加により抑制され、その抑制は anti IFN- γ mAb により阻止された。Df 刺激リンパ球 IgE 産生の IFN- γ による抑制効果は濃度依存性が認められた。

文 献

- 1) Okudaira, H. and Ishizaka, K.: Reagin antibody formation in the mouse: XI. Participation of long-lived antibody forming cells in persistent antibody formation. *Cell. Immunol.* 58, 188-201, 1981.
- 2) Ohta, K., Akiyama, K., Ogita, T., Okudaira, H., Ito, K., et al.: Human IgE, IgG and IgE antibody synthesis in vitro. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 63, 129-138, 1980.
- 3) Okudaira, H., Ohta, K., Ogita, T. and Miyamoto, T.: Human IgE antibody-forming cells: Radio-resistant and radio-sensitive subpopulations. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 65, 162-167, 1981.
- 4) Yang, X.-D., De Weck, A.L. and Stadler, B.M.: Effect of recombinant human interleukin 4 on spontaneous in vitro human IgE synthesis. *Eur. J. Immunol.* 18, 1699-1704, 1988.
- 5) Kitamata, H., Yoshida, A., Fujimoto, M. and Mikawa, H.: Effect of vasoactive intestinal peptide, somatostatin, and substance P on spontaneous IgE and IgG4 production in atopic patients. *J. Immunol.* 150, 4630-4640, 1993.
- 6) Okudaira, H., Mori, A., Akiyoshi, K., Yamamoto, K., Suko, M., et al.: Interleukin-4 gene expression and IgE responsiveness. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 94, 184-186, 1991.
- 7) Mori, A., Yamamoto, K., Suko, M., Watanabe, N., Ito, M., et al.: Interleukin-4 gene expression in high and low IgE responder mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 92, 100-102, 1990.
- 8) 岩崎栄作, 関根孝哉, 馬場 実, 斉藤保之, 池田旭, 石井 暢: 全自動 EIA 装置 IMx による血中 IgE 測定法の基礎的, 臨床的検討. *小児科臨床* 42, 1361-1375, 1989.
- 9) Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. and Coffman, R.L.: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2348-2357, 1986.
- 10) Pène, J., Rousset, F., Brière, F., Chrétien, I., Bonnefoy, J.-Y., et al.: IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferon γ and α and prostaglandin E_2 . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6880-6884, 1988.
- 11) Swendeman, S. and Thorley-Lawson, D.A.: The activation antigen BLAST-2, when shed, is an autocrine BCGF for normal and transformed B cells. *EMBO J.* 6, 1637-1642, 1987.
- 12) Liu, Y.-Y., Cairns, J.A., Holder, M.J., Abbot, S. D., Jansen, K.U., et al.: Recombinant 25-kDa CD23 and interleukin 1 α promote the survival of germinal center B cells; evidence for bifurcation in the development of centrocytes rescued from apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 21, 1107-1114, 1991.
- 13) Sherr, E., Macy, E., Kimata, H., Gilly, M. and Saxon, A.: Binding the low affinity Fc ϵ R on B cells suppresses ongoing human IgE synthesis. *J. Immunol.* 142, 481-489, 1989.
- 14) Delespesse, G., Hofstetter, H. and Sarfati, M.: Low-affinity receptor for IgE (FcER II, CD23) and its soluble fragments. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 90, 41-44, 1989.
- 15) Chrétien, I., Pène, J., Brière, F., De Waal Malefijt, R., Rousset, F. and de Vries, J.E.: Regulation of human IgE synthesis. I. Human IgE synthesis in vitro is determined by the reciprocal antagonistic effects of interleukin 4 and interferon- γ . *Eur. J. Immunol.* 20, 247-251, 1990.
- 16) 柳原行義: リンパ球からのアレルギー情報. *医薬の門* 32, 325-333, 1992.
- 17) Yokota, A., Kikutani, H., Tanaka, T., Sato, R., Barsumian, E.L., et al.: Two species of human Fc ϵ receptor II (Fc ϵ RII/CD23): Tissue-specific

- and IL-4-specific regulation of gene expression. *Cell* 55, 611-618, 1988.
- 18) 柳原行義: Fc ϵ RII とアレルギー. *Medical Immunology* 21, 101-112, 1990.
 - 19) Shapira, S.K., Vercelli, D., Jabara, H.H., Fu, S. M. and Geha, R.S.: Molecular analysis of the induction of IgE synthesis in human B cells by interleukin 4 and engagement of CD40 antigen. *J. Exp. Med.* 175, 289-292, 1992.
 - 20) Rousset, F., Robert, J., Andary, M., Bonnin, J.-P., Souillet, G., et al.: Shifts in interleukin-4 and interferon- γ production by T cells of patients with elevated serum IgE levels and the modulatory effects of these lymphokines on spontaneous IgE synthesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87, 58-69, 1991.
 - 21) Cardell, S., Sander, B. and Möller, G.: Primary stimulation of CD4+ cells in the presence of IL-4 or IFN- γ alters the frequencies of cytokine-producing cells at restimulation. *Scand. J. Immunol.* 36, 769-777, 1992.

SPONTANEOUS IgE PRODUCTION IN ASTHMATIC CHILDREN

Tokuko Mukouyama, Waka Ito, Kunio Ichikawa, Koichi Yamaguchi and Minoru Baba

Department of Pediatrics, Doai Memorial Hospital

Takeshi Noma

Department of Pediatrics, Saitama Medical School

In this study, we demonstrated spontaneous IgE production by peripheral blood mononuclear cells of asthmatic children.

In 26 asthmatic children, the level of spontaneous IgE ranged 0.1-15.0 IU/ml and in 5 healthy normal children showed under 0.051 IU/ml.

In 5 of asthmatic children, specific antibody of *Dermatophagoides farinae* was detected from PBMC by CAP RAST. In healthy normal children, specific antibody of Df was not detected.

Spontaneous IgE production by PBMC and serum IgE level showed well correlation ($r=0.835$, $p<0.001$).

Spontaneous IgE production and specific antibody of Df by PBMC also showed well correlation ($r=0.717$, $p<0.001$) IgE production of asthmatic children was inhibited by IFN- γ .