

学 位 論 文 題 名

ヒト末梢血リンパ球におけるインターリュウキン 4  
による IgG 4 および IgE 産生の誘導

学位論文内容の要旨

I. は じ め に

インターリュウキン 4（以下 IL-4）が B および T リンパ球に種々の作用を有することは広く知られている。マウスでは、IL-4 がリポポリサッカライド刺激 B 細胞のポリクローナルな IgE および IgG 1 産生誘導を促す一方、IgG 2 b および IgG 3 の産生を抑制することが知られている。一方、ヒトでは IL-4 が健常人末梢血リンパ球の IgE 産生を誘導することが知られているが、特異的かつ精度の高い IgG サブクラス測定法がないために、IL-4 がヒト IgG サブクラス産生に影響を与えるか否かについては明かではなかった。著者は、ヒト IgG サブクラスに対するマウスモノクローナル抗体（MoAB）を用いることにより、ヒト単核球培養上清中の 4 つの IgG サブクラスの定量が可能な特異的かつ精度の高い ELISA を確立した。更に本方法を用いて、ヒト末梢血単核球（PBL）においては、IL-4 が IgE ばかりではなく IgG 4 の産生を誘導し、かつこの IL-4 により誘導された IgE/IgG 4 産生は  $\gamma$ -インターフェロン（IFN- $\gamma$ ）によって抑制されることを明らかにした。

II. 材 料 と 方 法

リコンビナント IL-4 は Genzyme 社、リコンビナント IFN- $\gamma$  は、塩野義製薬 KK、マウス抗ヒト IL-4 モノクローナル抗体は、小野薬品 KK より得た。健常成人より得たヘパリン加末梢血を Ficoll-Hypaque を用いた比重遠心法により PBL を得、10% 不活化牛胎児血清、2 mM グルタミン、50 U/ml ペニシリン、50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを加えた RPMI1640 培地に浮遊した。培養は細胞の最終濃度  $2 \times 10^6$ /ml、総量 1 ml で、12 x 75mm Falcon チューブを用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 大気下でおこなった。培養終了後、チューブを 450 g、5 分間遠心し培養上清を集め、ELISA による測定まで -20°C で凍結保存した。培養上清中の IgE 定量はマウス抗ヒト IgE MoAB（ヤマサ醤油 KK）を抗原として用いた ELISA によった。培養上清中の

IgG 総量・IgG サブクラスの定量はマウス抗ヒト IgG あるいは IgG サブクラス MoAB (Oxoid 社) を用いた ELISA によった。

### Ⅲ. 結 果

IgG サブクラス ELISA の検量線・特異性・精度：WHO-REF-SERA (67/97) をもちいた検量線からその測定下限はそれぞれ、IgG1, 10ng/ml, IgG 2, 5 ng/ml, IgG3, 2 ng/ml, IgG4, 2 ng/ml であった。その特異性を精製 IgG サブクラスを抗原として用い検討した時, その cross-reactivity は 4 %以下であった。ヒト PBL の pokeweed mitogen 培養上清につきその総 IgG 量と, 同一検体の 4 つの IgG サブクラス量を測定した時, 総 IgG サブクラス量の総和との相関は, きわめて高かった ( $r=0.990$ ,  $p<0.001$ )。

ヒト PBL による IL 4 誘導 IgG サブクラス産生の培養期間：本 ELISA を用いて, IL-4 が IgE 産生を誘導する条件下で, IgG サブクラス産生に与える影響につき検討を加えた。  $2 \times 10^6$  個の PBL を 400 単位/ml の IL-4 の存在・非存在下に培養すると, 培養上清中には, IL-4 非存在下では培養期間が長くなるに伴い spontaneous な IgG1, および IgG2 産生を認めたが, IgG3, IgG4, および IgE の産生は認められない。一方, 400 単位/ml の IL-4 存在下においては, IgE 産生の誘導とともに IgG4 産生の誘導が認められ, 培養 9 日から 12 日目にその誘導はプラトーを示した。IL-4 の添加は, IgG1 あるいは IgG2 の spontaneous な産生に additive な効果を何等示さなかった。

IL-4 の容量反応性： $2 \times 10^6$  個の PBL を種々の濃度の IL-4 存在下で培養し, 培養 10 日目に培養上清中の IgE および IgG サブクラスを定量すると, 添加する IL-4 の濃度が増加するにつれ, IgE とともに IgG 4 の産生量は増加し, 400 単位/ml で両者の最大の産生誘導を認めた。

IL-4 誘導 IgG4 産生の抗 IL-4 抗体・IFN  $\gamma$  による抑制： $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度の抗 IL-4 抗体を加えることにより, IL-4 誘導 IgG4・IgE 産生は完全に抑制されるが, IgG1・IgG2 の spontaneous な産生は抗 IL-4 抗体により抑制されないことから IgG4 産生の誘導が IL-4 特異的であることが示された。また  $100 \text{U/ml}$  の IFN- $\gamma$  の存在により, IL-4 誘導 IgG4・IgE 産生は, 完全に抑制された。

### Ⅳ. 考 按

本研究において著者は, ヒト PBL 培養上清中の 4 つの IgG サブクラス定量を可能とする,

特異的かつ感度の高い ELISA を確立した。本 ELISA の測定下限は、それぞれ IgG1 で 10 ng/ml, IgG2 で 5 ng/ml, IgG3 および IgG4 で 2 ng/ml であった。本 ELISA に用いた MoAB の IgG サブクラス特異性は、性格の異なる数種類の assay を用いた IUIS/WHO 協同研究によりすでに明かにされているが本研究においても、それぞれの IgG サブクラスが 98% 以上に精製された精製 IgG サブクラス蛋白を用いた場合その交差反応性は 4 % を越えず、特異性は十分と考えられた。つぎにこの ELISA を用いてヒト PBL 培養上清中の IgG サブクラスを定量することにより、ヒト PBL に及ぼす IL-4 の効果を検討した。IL-4 をヒト PBL に加えて培養すると IgE 産生に加え、IgG4 の著しい産生が認められた。このとき他の 3 つの IgG サブクラスの産生には、影響が認められなかった。この IL-4 で誘導された IgG4 産生は抗 IL-4 MoAB 添加により、IgE 産生と共に抑制されたことから、IL-4 特異的であるものと考えられた。

ヒトにおいて、血清 IgG4 と IgE とが共通の調節を受けているらしいことが、いくつかの病的状態においてすでに示唆されている。すなわち、1) 慢性寄生虫感染においては、特異的 IgG4 と IgE 抗体が産生される、2) アレルギー患者において血清 IgG4・IgE 値はともに高値となる、3) IgA 欠乏症患者における血清 IgG4・IgE 値は平行に変動する、4) 高 IgE 症候群の患者血清中の IgG4 と IgE とは、きわめて高い正の相関が認められる、などである。IL-4 がいかなる機序で IgG4 合成を増強するかについては、まだ不明であるものの、マウスにおいては、IL-4 は、IgE・IgG1 産生に commit された細胞の増殖ではなく、IgG1・IgE へのクラススイッチを強く誘導することにより、IgG1・IgE 産生の増強を促すことがあきらかにされており、ヒトにおいても同様の機序が働いている可能性が示唆される。本研究では、IFN- $\gamma$  による IgG4 産生の抑制効果は、IgE に対する抑制効果より弱いことが認められた。ヒト PBL の in vitro 抗体産生系として従来より用いられている、PWM, あるいは、Staphylococcus aureus Cowan I 刺激系では、IgE 産生の誘導は認められておらず、この刺激系における IgE 産生の抑制は、mitogen により誘導される IFN- $\gamma$  による抑制によるものと考えられている。しかしながら、この 2 つの抗体産生系においても、IgG4 産生が認められることから、IgG4 産生の調節には、IL-4・IFN- $\gamma$  に加えて、細胞間の相互作用あるいは、他のサイトカインが、複雑に関与している可能性が示唆される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授    松 本 脩 三

副 査 教 授    小 林 邦 彦

副 査 教 授    皆 川 知 紀

インターレウキン4（以下 IL-4）がBおよびTリンパ球に種々の作用を有することは広く知られている。ヒトでは IL-4 が健常人末梢血リンパ球の IgE 産生を誘導することが知られているが、特異的かつ精度の高い IgG サブクラス測定法がないために、IL-4 がヒト IgG サブクラス産生に影響を与えるか否かについては明らかではなかった。著者は、ヒト IgG サブクラスに対するマウスモノクローナル抗体（MoAB）を用いることにより、ヒト単核球培養上清中の4つの IgG サブクラスの定量が可能な特異的かつ精度の高い ELISA をまず確立した。更に本方法を用いて、ヒト末梢血単核球（PBL）においては、IL-4 が IgE ばかりでなく IgG4 の産生を誘導し、かつこの IL-4 により誘導された IgE/IgG4 産生は  $\gamma$ -インターフェロン（IFN- $\gamma$ ）によって抑制されることを明らかにした。

培養上清中の IgE 定量はマウス抗ヒト IgE MoAB を抗原として用いた ELISA により行い、一方培養上清中の IgG 総量・IgG サブクラスの定量はマウス抗ヒト IgG あるいは IgG サブクラス MoAB を用いた ELISA によった。

つぎに本 ELISA を用いて、IL-4 がヒト PBL に *in vitro* の系で IgE 産生を誘導する条件下で、IgG サブクラス産生に与える影響につき検討を加えた。培養上清中には、IL-4 非存在下では培養期間が長くなるに伴い spontaneous な IgG1、および IgG2 産生を認めたが、IgG3、IgG4、および IgE の産生は認められない。一方、400単位/ml の IL-4 存在下においては、IgE 産生の誘導とともに IgG4 産生の誘導が認められ、培養9日から12日目にその誘導はプラトーを示した。IL-4 の添加は、IgG1 あるいは IgG2 の spontaneous な産生に additive な効果を何等示さなかった。IL-4 誘導によるこのような IgG4 と IgE の産生は  $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度の抗 IL-4 抗体を加えることにより、完全に抑制されるが、IgG1・IgG2 の spontaneous な産生は抗 IL-4 抗体により抑制されないことから IgG4 産生の誘導が IL-4 特異的であることが示された。一方また  $100 \text{U/ml}$  の IFN- $\gamma$  の添加によっても、IL-4 誘導 IgG4・IgE 産生は、完全に抑制された。

本研究において著者はこのように抗ヒト IgG サブクラスモノクローナル抗体を用いた特異的

かつ高感度の ELISA 法により、ヒトリンパ球培養上清中の 4 つの IgG サブクラスの定量法を確立した。この ELISA の測定下限は、それぞれ IgG1 で 10ng/ml, IgG2 で 5 ng/ml, IgG3 および IgG4 で 2 ng/ml であった。本方法を用いて①ヒト IL 4 による末梢血リンパ球の IgG サブクラス産生に及ぼす効果を検討した結果、IL 4 は、IgE 産生の増強に加えて、IgG4 産生を強く誘導したが、IgG1, IgG2, あるいは IgG3 産生には影響を与えなかった。②IL-4 により誘導される IgG4 および IgE 産生は、IFN $\gamma$  あるいは、抗 IL 4 モノクローナル抗体により用量依存性に抑制された。③IL 4 が IgE 産生のみならず IgG サブクラス産生にも重要な調節的役割を演じていることが明らかになった。

以上のようにヒト PBL 培養上清中の 4 つの IgG サブクラス定量を可能とする特異的且つ感度の高い ELISA 法を確立した点とそれを用いて r-IL4 及び r-IFN- $\gamma$  の IgG4 疾患に及ぼす影響をはじめて検討し、上記の如く、IgG4 と IgE が共通の調節を受けていると考えられる結果を得たことはこの種の領域の研究として十分評価し得るものと考えられる。副査の小林・皆川両教授からは IgG サブクラス測定上の方法論とサイトカインによる IgE, IgG4 産生抑制のメカニズム等につき質問がなされ、さらに皆川教授・小野江教授からも幾つかの御討議を頂戴したが、いずれに関しても正確な答えがなされたものと判断された。

よって博士の学位授与に充分値するものと判定される。