

抗原特異的抗体の免疫グロブリン 産生系に与える影響

亀子文子¹⁾, 上原良雄²⁾

Augmentation of antibody response of immune complex-ingested mononuclear cells (MNC) by antigen specific antibody

Anti-*S.pyogenes* antibodies were examined for their effects on antibody production of mononuclear cells (MNC) which were previously stimulated by the phagocytosis of specific immune complexes. Freshly prepared 1×10^6 MNC, without any stimulation, could produce 37ng polyclonal antibodies in the 1ml culture. Stimulation of MNC using immune complexes formed in antigen excess slightly augmented the antibody production or had no influence on production. On the other hand, immune complexes formed in antibody excess inhibited the antibody production and the amount of antibody produced was reduced to 9 ng. Despite this, the inhibitory activity was abrogated and the antibody production was augmented by treatment of complex-ingested MNC with free specific antibody; 10 times more antibodies were produced than that of the culture without the treatment. However, this augmentation could not be observed when the treatment was performed within 60 minutes after phagocytosis. Amount of antibodies produced was proportional to the amount of specific antibody used for the treatment. This augmentation was also performed by the use of anti-*S.pyogenes* IgG-F (ab')₂ instead of specific intact IgG. These results indicate that antigen specific free antibody has potent immuno-regulatory properties and these are probably performed via its binding to the degraded antigen presented on the surface of antigen presenting cells.

Key words:

antibody response, immune complex, antigen presenting cell, IL-1 β mRNA,
immune complex formed in antibody excess

1) 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科; Fumiko Kameko, Dept. of Medical Technology, School of Allied Medical Sciences, Shinshu Univ.

2) 長野県庁県立病院課; Yoshio Uehara, Prefectural Hospital Division, Nagano Prefectural Government, Nagano, Japan.

はじめに

Free な状態にある抗原特異的な抗体の、特異的免疫複合体で予め刺激されている末梢単核球 (MNC) の抗体産生応答に対する効果を調べた。in vivo に投与された免疫複合体の、抗体産生応答に与える影響については多くの報告がある。抗原過剰の免疫複合体の投与によって、抗体産生応答は活性化され、抗原特異的抗体産生が増強される¹⁾。それに対して、抗体過剰の複合体を投与した場合には、免疫原性が失われるばかりでなく、抗体産生に対してむしろ抑制的に働く^{2,3)}。免疫複合体はまた、試験管内で単球に直接働いて IL-1 β mRNA の産生を促す。我々が別の機会に報告したとおり、抗体産生応答の第 1 段階と考えられる抗原提示細胞レベルでも、抗原過剰の免疫複合体による刺激によって、免疫系の賦活物質と考えられる IL-1 β mRNA の産生が見られるが、抗体過剰の条件では IL-1 β mRNA の産生はほとんど見られなくなってしまう。さらに興味のあることに、抗体過剰の複合体を単球に貪食させ、1 時間以上培養したのち洗浄し、free の特異抗体 {F(ab')₂} を 10 分間だけ作用させ洗浄し、培養を続けると大量の IL-1 β mRNA を産生するようになる⁴⁾。このことは、免疫複合体及び free の抗体が、抗イデオタイプ抗体による抑制の惹起⁵⁾とは別に、抗原提示細胞を通じて直接抗体産生応答を制御する機構が存在することを示唆するものである。我々の興味は、抗原特異的なフリーの抗体が、特異的複合体によってあらかじめ刺激された MNC の抗体産生を制御するかどうか調べるところにあった。

今回の実験では免疫複合体として、抗 *S. pyogenes* / *S. pyogenes* 複合体を用いた。粒子状抗原を用いた理由は、1 つには作られた複

合体の抗原と抗体の比をうまく調整しやすいことであり、さらに、複合体を洗浄して未結合の抗体を除きやすいからである。また、*S. pyogenes* 感染症は多いので、ヒト抗 *S. pyogenes* 抗体を入手しやすいというのも理由の 1 つである⁶⁾。MNC の 12 日間の培養によって、自発的にわずかの抗体産生が起こる。ところが、抗体過剰の免疫複合体を加えて刺激した場合には抗体産生は抑制され、産生量はもとの 25% となった。抗体過剰の複合体を貪食させた後、洗浄して free の特異抗体を作用させると抗体産生は抑制を受けた状態の場合に比べ、10 倍も増加した。添加した特異抗体の作用時間を一定 (10 分間) にして、至適添加時刻を経時的に調べると、貪食後 60 分以上経過した後に抗体を添加した場合のみ、抗体産生量が増加した。この 60 分という時間は抗原提示細胞が抗原の貪食の後、抗原を分解して細胞表面に提示する時間と一致している⁷⁾。この抗体産生の増強は F(ab')₂ でも可能であった。これらのことは、free の特異抗体が、免疫複合体を貪食した後の MNC の抗体産生を、抗原提示細胞のレベルで、しかも、Fc リセプターを介さずに制御することを示している。

材料及び方法

1. MNC

健康成人のうち、*S. pyogenes* に免疫応答を示すもの (ASO 値が 166 Todd 単位以上のもの) の末梢血液から、比重遠心法によって MNC を分離した。

2. *Streptococcus pyogenes*

臨床分離の株をハートインフュージョンブイヨンで増菌培養したのち、1%ホルマリオン加生食で 1 時間処理し、固定、滅菌した後、生食で洗浄してから使用した。この細菌浮遊

液は4℃で1カ月以上安定していた。細菌数はブイヨンから一定量とり、血液寒天培地の混釈培養で測定した。

3. 抗 *S.pyogenes* モノクローナル抗体 (mAb)

MAB 8631 monoclonal strep A. (コスモバイオ) を使用した。

4. ヒト抗 *S.pyogenes* 抗体

ASO 価の高い血清からプロテイン A/セファロース4B カラムを用い、IgG を分離した。大量に培養し、1%ホルマリン生食で固定した *S.pyogenes* を用い、バッチ法によってアフィニティークロマトグラムを行った。0.58%酢酸/0.15M NaCl で溶出し、PBS で透析を行ったのち、抗体として使用した。一部はペプシンで消化し(1%ペプシン, 0.2M 酢酸ナトリウムバッファー, pH4.5 37℃, 20時間), Sephacryl S-300で精製後、IgG-F(ab')₂ として使用した。

5. 免疫複合体

ホルマリン固定の *S.pyogenes* 1×10^6 に抗 *S.pyogenes* mAb を $1 \mu\text{l}$, $0.1 \mu\text{l}$, $0.01 \mu\text{l}$, $0.001 \mu\text{l}$, または $0 \mu\text{l}$ 加え、室温で5分間放置後、PBS で洗浄して、抗体過剰から抗原過剰までの免疫複合体を作成した。

6. IgG の定量

Stocker らの方法⁹⁾にしたがって ELISA 法で定量した。

7. MNC による複合体の貪食と培養

1ml の10%FCS 加 RPMI 1640培地に浮遊した 1×10^6 の MNC に、 5×10^4 個の *S.pyogenes* を含む抗原過剰から抗体過剰までの複合体を加え、1500rpm 5分遠心し、37℃ に3分間インキュベートして複合体を貪食させ、37℃, 5%CO₂ 条件下で70分間培養した。一部はそのまま培養を継続し、12日後に上清の IgG 量を定量した。残りの各々の培養チューブ中の MNC を培養液で洗浄後、種々

の濃度のヒト抗 *S.pyogenes* 抗体、または抗 *S.pyogenes* mAb を加え、室温に10分間放置した後、培養液で2回洗浄し、12日間培養を継続した。その後上清の IgG 濃度を定量した。コントロールに、複合体で刺激しない MNC の培養と、mAb そのものの抗原性について検討した。

8. Free 特異抗体による処理の至適時刻の検討

MNC に免疫複合体を貪食させたあと、20分、30分、40分、50分、65分、80分経過後洗浄し、MNC 1×10^6 あたり $1 \mu\text{l}$ の抗 *S.pyogenes* mAb を10分間作用させ、洗浄、上記と同じ条件で12日間培養後、上清の IgG 濃度を定量した。

9. ノーザンブロッティング

ヒト単球に *S.pyogenes* 複合体(細菌/抗体 μl ; 10^6 :1)を貪食させ培養し、70分後培養液で洗浄し、特異抗体 $1 \mu\text{l}$ を加え10分間室温に放置した。培養液で洗浄後37℃, 5%CO₂ で4時間培養した。培養後 Single step 法 (guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction)⁹⁾により、total RNA を抽出した。RNA の変性はホルムアルデヒド法を用い、1レーンあたり $20 \mu\text{g}$ の total RNA を入れ電気泳動し、ノーザンブロッティングを行なった¹⁰⁾。また一部は貪食後ただちに 5×10^{-6} M のクロロキンで1時間処理し同様の操作を行なった。コントロールに複合体貪食のみ、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の LPS 添加、MNC をクロロキン処理後 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 添加の培養についても IL-1 β mRNA の検出を行なった。

結 果

1. 免疫複合体の免疫原性

10%FCS 加 RPMI 1640培地中で12日間

培養したとき、MNCは試験管内で無刺激（MNCのみ；細菌、抗体は加えない）でも自発的に抗体を産生した。その産生量は 1×10^6 当たり、 37 ng/ml であった。この系に免疫複合体を添加してMNCを刺激すると、抗体が過剰の状態で作られた複合体ほど、抗体産生量が低下し、細菌(個数)/抗体(mAb: μl)の比が $10^6:1$ とき、 9 ng/ml となって、MNCの自発的抗体産生量の $1/4$ に低下した。抗体産生量は細菌/抗体の比に比例して回復していき、 $10^9:1$ のときには 45 ng/ml となって、MNCの自発的産生の場合より僅かに上昇した。この値が有意に増加しているのかどうか、さらに例数を多くして検討中である。しかし、少なくとも抑制はされなかった。それに対し

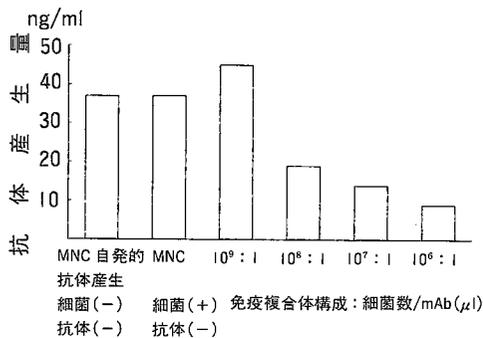


図1 種々の抗原，抗体構成比の複合体によるMNCの刺激とIgG産生：細菌細胞当たり $1 \times 10^9 \mu\text{l}$ 、 $1 \times 10^8 \mu\text{l}$ 、 $1 \times 10^7 \mu\text{l}$ 、 $1 \times 10^6 \mu\text{l}$ の特異抗体を反応させて複合体を形成した。各々の複合体をMNCに貪食させて、12日間培養後IgGを定量した。コントロールとして、特異抗体無添加，細菌無添加(自発的抗体産生)，および細菌のみ添加のMNC培養を行った。

て、抗体過剰の複合体の場合には明らかに抑制された(図1)。MNCのみで培養した場合とMNCに抗体のみを添加した場合を比較すると、抗体産生量の増加は認めず、抗体そのものはマイトジェニックには働かなかった。しかし、抗体の添加によりわずかに抑制がみられた($n=4$, $P<0.01$) (表1)。複合体による抑制が70%以上となるのに比べると30%程度でありそれ程大きくはなかった。

2. Freeの特異抗体による，複合体刺激MNCの抗体産生の増強

図1に示したとおり，細菌/抗体比が $10^6:1$ の複合体は，MNCの自発的抗体産生に対して抑制的に働いた。これと同一の条件で刺激したMNCを70分後に，freeの特異抗体で10

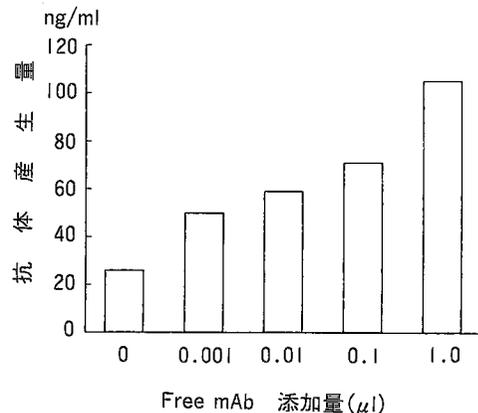


図2 抗体過剰の複合体(細胞当たり $1 \times 10^6 \mu\text{l/mAb}$ と複合体を形成)を貪食したMNCに対する，freeの特異mAbの作用：抗体過剰の複合体を貪食して70分後，freeのmAbを10分のみ添加，培養液で2回洗浄後培養し，IgGを定量した。

表1 抗*S.pyogenes*モノクローナル抗体がMNCのIgG産生に及ぼす影響

抗体使用量(μl)	0	1×10^{-3}	1×10^{-2}	1×10^{-1}	1
IgG産生量(ng/ml)	37 ± 5	34 ± 3	32 ± 3	30 ± 4	27 ± 3

(平均 \pm SD $n=4$)

分間のみ再刺激すると、複合体による抑制状態が解除されて、抗体の添加量に比例して抗体産生量が増加した(図2)。

3. mAbの添加時刻と抗体産生量

上に示したとおり、抗体過剰の複合体を食食して抑制状態にあるMNCに、freeの特異抗体を添加して再刺激すると、添加抗体に対してdose dependentに抗体産生が増強された。この増強効果と抗体の添加時刻との関係を調べるために、抗体添加のkinetic studyを行った。その際、抗体の作用時間は抗原抗体反応を行うのに必要な最小限の時間(10分間)にとどめた。図3に示すように、抗体添加時刻が食食後60分未満では、抗体産生増強効果はまったく認められなかった。それに対して、抗体の添加時刻が60分を越えると徐々に抗体産生が増加していき、85分では約10倍の増加が観察された。このことは、抗原提示細胞による抗原の分解、あるいは提示と、抗体添加の効果との間に密接な関係があることを強く示唆している。抗体産生増強効果が抗原の分解と関係があるとしたら、その効果は、添加

された抗体と抗原の分解産物を作る複合体に由来するはずである。この複合体がどの様にMNCとinteractしているか調べるために、添加抗体をペプシンで消化してFc部分を除き、 $F(ab')_2$ としたうえで実験を行った。

4. ヒト抗*S.pyogenes* IgG- $F(ab')_2$ による抗体産生の増強

図4に示すように、添加抗体は必ずしもintactなものである必要がなく、 $F(ab')_2$ でもmAbと同様な効果をあげることができた。このことから、抗原分解産物と特異抗体のつくる複合体が、抗体産生増強活性を發揮するためにはFc部分が必要ではないことがわかった。ところが、この複合体が提示細胞の周囲に放出されたfreeの抗原分解産物とfreeの特異抗体との間で作られたものであるとしたら、この複合体自体freeな状態で存在していることになる。しかも複合体にはFc部分が存在しないのであるから抗原提示細胞を食食という形で再度刺激することはできない。これらのことから、この実験データは、後から添加されたfreeの特異抗体が結合したのは、

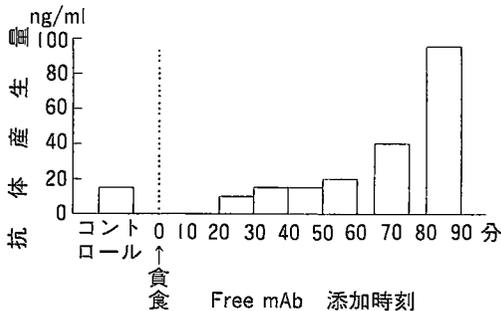


図3 Freeの特異mAb添加至適時刻の検討: MNCに抗体過剰の複合体を食食させた後、freeの特異mAbを食食後20分から30分まで、30分から40分まで、40分から50分まで、50分から60分まで、65分から75分まで、80分から90分まで作用させ、培養、IgGを定量した。

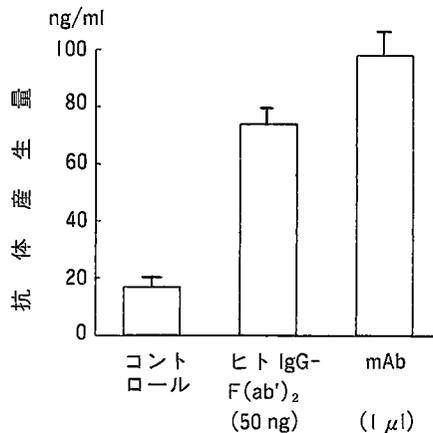


図4 ヒト抗*S.pyogenes* IgG- $F(ab')_2$ による、抗体過剰複合体を食食したMNCの抗体産生の増強

分解されてすでに提示されている抗原であることを示唆している。

5. Northern blot 法による IL-1 β mRNA の検出

抗体過剰の複合体貪食によって、少量の IL-1 β mRNA の産生が見られたが、複合体貪食後 free の特異抗体 (mAb) を加えると IL-1 β mRNA の産生は顕著に増加した。しかし、複合体貪食後 5×10^{-5} M のクロロキンで処理し、リソゾームの抗原分解能を阻害すると、IL-1 β mRNA の産生は完全に抑制され、特異抗体を加えても mRNA の産生は増加しなかった。クロロキンは可溶性抗原である LPS の刺激能は阻害しなかったことから、クロロキン処理によって貪食細胞のすべての機能が損なわれたわけではなかった (図

5)。IL-1 β mRNA の産生増強はヒト特異抗体、ヒト IgG-F(ab) $_2$ 特異抗体を用いても同様に見られた。

考 察

この実験では、あらかじめ抗体過剰の免疫複合体で刺激して抗体産生応答が抑制されている状態の MNC に対する、free の特異抗体の作用について調べた。生体に投与された抗体は抗体産生応答を抑制する^{11,12)}。また、Caulfield ら³⁾によれば、免疫複合体による抗体産生の増強や抑制と、複合体の抗原と抗体の比は密接に関係している。抗原過剰な複合体を *in vivo* に投与すれば、抗体産生は増強され、逆に、抗体過剰の複合体の投与では抑制された。この実験結果は、我々の *in vitro* で

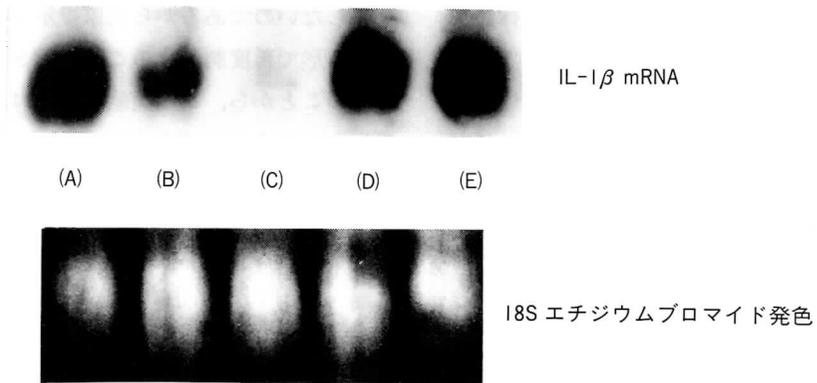


図 5 Northern blot 法による IL-1 β mRNA の検出：ヒト単球に *S.pyogenes*/抗 *S.pyogenes* 抗体複合体 (抗体過剰) を貪食させ、70分後特異抗体を10分間作用させた。そのうちの一部には抗原のプロセッシングを阻止するため、複合体貪食後 5×10^{-5} M のクロロキンを60分間作用させた。total RNA を分離し、IL-1 β cDNA をプローブにしノーザンブロッティングを行なった。

- (A)：複合体貪食後、特異抗体を作用
 (B)：複合体貪食のみ
 (C)：複合体貪食、クロロキンで処理後、特異抗体を作用
 (D)：10 μ g/ml LPS を MNC に添加 (コントロール)
 (E)：MNC をクロロキンで処理後、10 μ g/ml LPS 添加

の実験結果とはほぼ一致した。これらの作用のメカニズムについてはいくつか考えられる。例えば、この抑制効果は、抗イデオタイプ抗体の誘発によるものであり⁹⁾、あるいは、イデオタイプ特異的な抑制性T細胞の活性化によるものである¹³⁾。これらの説明の一部は正しいものと考えられる。しかし、我々が示したとおり、免疫複合体は、免疫応答の最後のステップである抗体産生に影響を与える以前に、免疫応答の入口にある抗原提示細胞に直接働いて、IL-1産生を制御することができる⁴⁾。IL-1産生が無ければ、免疫応答は進まない^{14,15)}。すなわち、複合体による抗体産生応答の制御は、イデオタイプ抗体の誘発や、抑制性T細胞の誘導以前に、少なくともその一部は、直接抗原提示細胞レベルで行われていることを示している。抗体過剰の複合体による抑制はかなり効果的に行われるが、抗原過剰の複合体による抗体産生増強の効果はそれほど大きくはない。抗体過剰の特異的複合体によって抗体産生を抑制されたMNCに、freeの特異抗体を作用させると、抑制のなかった状態に比べ、10倍の抗体が産生されるようになる。しかし、freeの抗体が培養系に存在できる時間を10分間に制限した場合、その時間を貪食直後から60分以上経過してからとらなければ、抗体産生応答が増強されることはない。抗原がプロセッシングを受けるのに要する時間は60分以上である⁷⁾。このことから、新たに加えられた抗体は、プロセッシングを受けて細胞外に放出された抗原となんらかの相互関係を持つことがわかる。またさらに、添加したfreeの抗体の作用は特異的である。なぜなら、*S.pyogenes* 複合体を貪食したMNCにアフィニティー精製のヒト抗*S.pyogenes* 抗体を添加するとIL-1活性の著しい上昇をみるが、固定*S.pyogenes* で吸収した

ヒトIgGを添加した場合にはIL-1活性の上昇は認められなかった⁴⁾。この相互関係についてはいくつかの場合が考えられる。第1の可能性は、放出されたfreeの抗原とfreeの特異抗体が、freeの複合体をつくり、Fcリセプターを介して抗原提示細胞を再刺激する場合である。しかし、この考えは正しいようには考えられない。なぜなら、こうしてできた複合体は抗体過剰となり、抑制的に働くと考えられるからである。また、さらに重要なことは、IgG-F(ab')₂を使った実験から、複合体が抗体産生増強効果を発揮するためには、IgGのFc部分は必要がないということである。ところが、このfreeの複合体は、IgGのFc部分を欠落しているという理由で抗原提示細胞とは、Fcリセプターを介したinteractionを行うことができない。したがって、freeの複合体のFc部分でMNCを再刺激するという仮説は非現実的である。次に第2の可能性は、MHCクラスII分子上に提示された抗原に特異抗体が結合して、MHCクラスII分子を介してなんらかのシグナルを抗原提示細胞内に伝え、モノカインの産生を促すというものである。Tredeらによれば、ある種の抗Iaモノクローナル抗体や、黄色ブドウ球菌のexotoxinなどのIa分子のリガンドは、単球にIL-1及びTNFを分泌させる¹⁶⁾。これと同様のメカニズムによって、freeの抗体がMNCの抗体産生応答を増強したということは十分考えられる。実際、過去の我々の実験では¹²⁵Iラベルの抗*S.pyogenes* IgG-F(ab')₂は、複合体を貪食した単球表面に結合することができた⁴⁾。

以上の実験から、freeの特異抗体は、特異的複合体を貪食したMNCの強力な免疫制御物質となり得ることがわかった。またこの増強効果のメカニズムは、抗原提示細胞上に

提示された抗原分解産物に free の特異抗体が結合して、MHC クラス II 分子を介したシグナル伝達が細胞内に向かって起こり、その結果、免疫系の増強物質である IL-1 などのモノカインが産生されることによる、というのが我々の仮説である。現在この仮説を証明するための実験を行っている。

ま と め

あらかじめ抗体過剰の免疫複合体で刺激すると、MNC の抗体産生応答は抑制された。そのような抑制状態の MNC に 70 分後に、free の特異抗体を添加すると、抗体産生応答は著しく増強された。この増強効果は抗原特異的 IgG-F(ab')₂ でも起こることがわかった。また、抗体過剰の複合体が免疫応答に抑制的に働く上記の事実を考慮すると、後から添加した free の特異抗体の作用は、食後分解されて細胞外に放出された抗原と、特異抗体のつくる複合体による MNC の再刺激ではないことが推察された。以上の結果から free の抗原特異的抗体は、抗体応答を制御することがわかった。

謝 辞

稿を終えるに当たり、ご指導頂きました信州大学小児科 小宮山淳教授に深謝します。

文 献

1) Terres, G. et al: Appearance of an early "primed state" in mice following the concomitant injections of antigen and specific antiserum. *J. Immunol.* 108 : 1473-1481, 1972.
 2) Henney, C. S. and Ishizaka, K.: Studies on the immunogenicity of antigen-antibody precipitates. II. The suppressive effect of anti-carrier and anti-hapten antibodies on the im-

munogenicity of dinitrophenylated human γ G globulin. *J. Immunol.* 104 : 1540-1549, 1970.

3) Caulfield, M.J. and Shaffer, D.: Immunoregulation by antigen/antibody complexes I. Specific immunosuppression induced in vivo with immune complexes formed in antibody excess. *J. Immunol.* 138 : 3680-3683, 1987.

4) Uehara, Y. et al: Anti-*Streptococcus pyogenes* IgG-F(ab')₂ augmentation of the interleukin-1 production by human monocytes phagocytizing the bacteria. 投稿中

5) Klaus, G. G. B.: Antigen-antibody complexes elicit anti-idiotypic antibodies to self-idiotopes. *Nature* 272 : 265-266, 1978.

6) Shackelford, P. G. et al: Human antibodies to Group A Streptococcal carbohydrate. Ontogeny, subclass restriction, and clonal diversity. *J. Immunol.* 140 : 3200-3205, 1988.

7) Roosnek, E. S. et al: Kinetics of MHC-Antigen complex formation on antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 140 : 4079-4082, 1988.

8) Stocker, J. W., Malavasi, F. and Trucco, M.: 酵素免疫測定法によるハイブリドーマ産生抗体のスクリーニング. 免疫実験法, 第 1 版, 165-172, 西村書店, 東京, 1985.

9) Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162 : 156-159, 1987.

10) 上松一永, 他: Northern blot 法による RNA 分析. 臨床免疫, 22 : 239-248, 1990.

11) Uhr, J. W. and Baumann, J. B.: Antibody formation. I. The suppression of antibody formation by passively administered antibody. *J. Exp. Med.* 113 : 935-939, 1961.

12) Moller, G. and Wigzell, H.: Antibody synthesis at the cellular level. Antibody induced suppression of 19S and 7S antibody response. *J. Exp. Med.* 121 : 969-989, 1965.

- 13) Caulfield, M. J. et al: Induction of idio-type-specific suppressor T cells with antigen/antibody complexes. *J. Exp. Med.* 157 : 1713-1725, 1983.
- 14) Mizel, S. B.: Interleukin 1 and T cell activation. *Immunol. Rev.* 63 : 51-54, 1982.
- 15) Aiello, B. F. et al: A role for cytokines in antigen presentation: IL-1 and IL-4 induce accessory functions of antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 144 : 2572-2581, 1990.
- 16) Trede, N. S. Geha, R. S. and Chatila, T.: Transcriptional activation of IL-1 β and tumor necrosis factor- α genes by MHC classII ligands. *J. Immunol.* 146 : 2310-2315, 1991.

受付日：1992年9月30日

受理日：1992年11月20日