

氏 名 (本籍)                    柴                    田                    忍

学 位 の 種 類                    博                    士                    ( 医                    学 )

学 位 記 番 号                    医                    第                    2 5 7 8                    号

学位授与年月日                    平 成                    5 年                    9 月                    8 日

学位授与の条件                    学位規則第 4 条第 2 項該当

最 終 学 歴                    昭 和                    60 年                    3 月                    26 日  
東北大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目                    Clonal Frequency Analysis of B Cells Producing Pathogenic Anti-DNA Antibody-Associated Idiotypes in Systemic Lupus Erythematosus.

(全身性エリテマトーデスにおける抗 DNA 抗体イディオタイプ産生 B 細胞クローン頻度の研究)

(主 査)

論 文 審 査 委 員                    教授 阿 部 圭 志                    教授 田 上 八 朗

教授 名 倉                    宏

# 論文内容要旨

## 【目 的】

全身性エリテマトーデス (SLE) は抗 DNA 抗体を初めとする多彩な自己抗体が出現し、これが臓器に沈着する代表的な自己免疫疾患である。本疾患における自己抗体発現にはポリクローナル B 細胞活性化あるいは特定の抗原刺激による自己抗体産生クローンの増大等が関与すると推定されているが、実証に乏しく不明な点が少なくない。本研究においては、SLE の急性増悪あるいは非活動期における B 細胞レパートリーを、B 細胞クローンの発現頻度を求めることにより解析した。そしてこれにより SLE における自己抗体産生クローンの消長と自己抗体発現機序との関連を追求した。

## 【方 法】

1982年アメリカリウマチ協会による SLE 診断基準をみたす症例で、未治療及びプレドニゾン10mg/日以下の例の血清及び末梢血 B 細胞を用いた。(1)血清中抗体価の測定：各症例及び正常人の血清を抗原 (DNA, 外来性抗原, 抗 ss DNA 抗体イディオタイプ O-81, 抗 ds DNA 抗体イディオタイプ NE-1 及びこれらに対するモノクロナル抗イディオタイプ抗体 D<sub>1</sub>E<sub>2</sub>, IF5) 被覆 96穴マルチウェル中で incubate し ELISA 法にて抗体価を検出した。(2)末梢血成熟 B 細胞クローン頻度の測定：各症例の末梢血 B 細胞を(1)と同様の抗原被覆ウェル中で培養した。この後に結合した IgG 型特異抗体を ELISA Spot 法で検出し、各抗体産生 B 細胞数として直接算定した。(3)limiting dilution 法による末梢血静止期 B 細胞クローン頻度の測定：末梢血 B 細胞を EB ウイルスに感染 (M.O.I=0.2) させた後、ウェル当り  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$  の細胞数にて培養した。B 細胞のトランスフォーム後 (培養開始後 2 - 3 週), 各培養上清中の IgM 抗体を ELISA 法にて検出し、陽性頻度を求めた。測定系が one hit type の Poisson 分布に従うことを確認し、クローン頻度を求めた。

## 【結 果】

(1)急性増悪期及び非活動期 SLE における血清中抗イディオタイプ (Id) 抗体：同一症例における両期の血清中抗 DNA 抗体及び抗 Id 抗体を比較した。すべての症例において急性増悪期に抗 ds- 及び ss DNA 抗体の上昇がみとめられた。これに対し非活動期には抗イディオタイプ抗体活性の上昇 (抗 O-81 : 7/11例, 抗 NE-1 : 7/11例) がみられた。(2)末梢血成熟期 B 細胞のクローン頻度：抗 ss DNA 抗体及びその Id である O-81 Id 陽性抗体を産生する B 細胞は、非活動期 SLE

群及び正常人群に比して、急性増悪期 SLE 群において有意に高頻度であった。外来性抗原（破傷風毒素、DNP 及び KLH）に対する抗体を産生する B 細胞クローンもまた急性増悪期 SLE において増大傾向を示したが、その上昇は抗 ss DNA 抗体及び O-81 Id 産生細胞ほど著明ではなかった。これに対し O-81 Id を認識する抗 Id 抗体産生 B 細胞は、急性増悪期 SLE 群に比して非活動期 SLE 群において有意に高頻度であった。(3)末梢血静止期 B 細胞のクローン頻度：抗 ss-及び ds DNA 抗体とこれらの Id である O-81 Id 及び NE-1 Id を産生する B 細胞は、急性増悪期 SLE 群においてクローン頻度が増大していた。外来性抗原に対する抗体を産生する B 細胞のクローン頻度は、各群間に有意差をみとめなかった。これに対し、O-81 Id 及び NE-1 Id に対する抗 Id 抗体を産生する B 細胞は、急性増悪期 SLE 群に比して、非活動期 SLE 群及び正常人群において有意に高頻度であった。この結果は、同一症例で経時的にみられた急性増悪期及び非活動期においても同様であった。

#### 【考 察】

SLE における自己抗体発現機序として、従来よりポリクローナル B 細胞活性化及び特定の自己抗体産生クローンの増大（Antigen driven process）が提唱されてきている。本研究によって、急性増悪期 SLE の末梢血成熟期 B 細胞レパートリーでは、ポリクローナルな B 細胞活性化と同時に、抗 DNA 抗体産生クローンが不均衡に増大していることが明らかとなった。この結果は、ポリクローナル B 細胞活性化に引き続いて Antigen driven process が起こることにより病的な自己抗体が産生されるとする Two step mechanism の存在を支持する。しかし、EB ウイルス感受性 B 細胞クローンの分析により、抗 DNA 抗体及びその Id 産生細胞の増大は、すでに静止期 B 細胞レパートリーの段階で生じていることもまた明らかとなり、この点は本研究の新知見と考えられる。このことは、急性期 SLE においては、Antigen driven process 以前の step ですでに B 細胞レパートリーの異常、すなわち自己抗体産生クローンの増加がみとめられることを示唆する。ここにおいては抗 DNA 抗体に関連する Id- 抗 Id システムの破綻が関与していることが推定される。

## 審査結果の要旨

全身性エリテマトーデス (SLE) は抗 DNA 抗体を初めとする多彩な自己抗体が出現し、これが臓器に沈着する代表的な自己免疫疾患である。本症における多彩な自己抗体産生が出現する機序として、(a)ポリクロナル B 細胞を活性化する機構が存在し、自己抗体産生クローンも刺激されるとする説、(b)特定の (微生物) 抗原が自己抗体産生クローンを刺激、活性化する結果、自己抗体が出現するとする Antigen-driven 説が提唱されてきた。しかし、実証は乏しい。

本研究は、SLE の急性増悪あるいは非活動期における B 細胞レパートリーを、B 細胞クローンの発現頻度を求めることにより解析し、SLE における自己抗体産生クローンの消長と自己抗体発現機序との関連を検討したものである。本研究では、SLE の各 B 細胞段階でのクローンレパートリー (各特異抗体の産生クローンの出現頻度) を限界希釈法を用いて検索した。

その結果、①SLE では各 B 細胞クローンの増大 (ポリクロナル B 細胞活性化) が認められたが、とりわけ抗 DNA 抗体及びこれに関連するイディオタイプ (Id) を有するクローンが著明に増大することが明らかにされた。②しかし、抗 DNA 抗体 Id 産生を抑制するとされる抗 Id クローンの数は、SLE ではむしろ減少していた。③前記所見は成熟 B 細胞 (末梢血 IgG 型抗体産生 B 細胞) レベルのみならず、抗原にまだ遭遇しえない早期 B 細胞 (EBV 感受性 IgG 型 B 細胞) レベルでも認められた。

以上の結果から、SLE の自己抗体発現には、(a)ポリクロナル B 細胞活性化機構が関与すること、(b)抗 DNA クローンの選択的増大があることより、Antigen-driven 機構も関与しうること、(c)SLE では(a)、(b)の他に、分化早期 B 細胞レベルにおいて、すでに自己抗体産生を制御するイディオタイプネットワーク調節の障害が存在し、これが抗 DNA クローン増大に関与することなど示唆される。本研究は SLE における自己抗体発現に関する新知見であり、学位授与に十分値するものと考えられる。