

CHARACTERISTICS OF IN VITRO AND IN VIVO PRODUCTION OF ANTIBODY TO RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS.

Yoshitaka Okamoto, Michinori Yokomizo,
Masami Usami, Kiyoshi Togawa

Department of Otorhinolaryngology
National Hospital of Mito and Akita University School of Medicine

Abstract

Anti-respiratory syncytial virus (RSV) IgG subclass, IgA and IgE antibody in nasal washing from nasal allergic patients and non-allergic healthy adults were studied at the end of a community outbreak of RSV infection.

Also, tonsillar lymphocytes (TL) obtained from 39 children were established in culture in vitro and analysed for RSV specific antibody synthesis after stimulation with pokeweed mitogen and live or ultraviolet light inactivated RSV.

In the nasal washings, IgG1, IgG3, IgG4, and IgA anti-RSV antibody were detected and IgA antibody titer was higher in those of the allergic patients (but not signifi-

nt).

Following stimulation with the virus, IgG1, IgA and low levels of IgG3 but no IgG2, IgG4, or IgE anti-RSV antibody could be detected in the TL culture supernatants. The anti-RSV antibody production in TL did not show any correlation with the preexisting levels of anti-RSV antibody in the serum of the subjects and TL from atopic children demonstrated IgA anti-RSV antibody more frequently and in higher content than the TL from non-atopic children.

These observations suggest that mucosal lymphoid tissue participate in IgG1 subclass antibody production.

Respiratory syncytial virus (RSV) に対する抗体産生について

岡本 美孝 横溝 道範 宇佐神 正海
国立水戸病院耳鼻咽喉科

戸川 清
秋田大学医学部耳鼻咽喉科学教室

はじめに

Respiratory syncytial virus (RSV) は、冬期の主要な気道感染ウイルスの1つであり、成人でも2~3年毎に上気道炎を生ずるとされているが、特に1才未満の乳幼児では時に重篤な気管支肺炎等下気道症状を併発し、呼吸器感染症による死因の大きなウェートを占めている⁽¹⁾。一方、広範な疫学調査から、RSV感染症が滲出性中耳炎発症の引き金となっていること⁽²⁾、鼻汁中抗RSV特異IgE抗体が、RSV感染症の重症度と相関すること⁽³⁾、動物実験においてRSV感染が、抗卵白IgE抗体産生に対して強いアジュバント作用を持つ事などが報告されている⁽⁴⁾。

今回、アレルギー患者及び健康非アレルギー者において、鼻腔洗浄液中、血中、さらに扁桃リンパ球を用いた *in vitro* の抗RSV抗体産生の比較・検討を行った。

方法

RSV感染終末期である1989年3月に当科外来を受診した鼻アレルギー成人患者24名、健康非アレルギー成人対照例17名より、鼻腔通気度測定用ノズルを用いて、加温生理食塩水にて鼻腔洗浄液を採取した。他方、扁桃摘出小児例の口蓋扁桃を細切後、密度勾配遠心により扁桃リンパ球を得て、種々の濃度のRSV抗原及び、pokeweed mitogenにて刺激後、24穴マイクロプレートにて5%CO₂下、37°Cで12日間培養し、培養上清を採取した⁽⁵⁾。これら鼻腔洗浄液、培養上清液について、抗RSVIgGサブクラス、IgA、IgE抗体をマイクロプレートELISA法にて測定した。抗ヒトIgGサブクラス抗体には、WHO/IUIS推選モノクローナル抗体を、抗ヒトIgE抗体にはclone GE-1モノクローナル抗体、抗ヒトIgA抗体には家兎抗ヒトIgAポリクロー

表 1 Degree of Reactivity with Human Affinity Purified IgG, IgA, IgM, or IgE

Reagent antisera	ELISA reactivity (O.D.) with			
	IgG	IgA	IgM	IgE
Anti-IgG1	> 1.999	0.050	0.027	0.018
Anti-IgG2	> 1.999	0.080	0.045	0.010
Anti-IgG3	0.178	0.010	0.015	0.011
Anti-IgG4	0.098	0.065	0.033	0.012
Anti-IgA	0.002	> 1.999	0.007	0.004
Anti-IgE	0.020	0.078	0.023	0.789

IgE employed for these studies was derived from an IgE myeloma protein. IgG, IgA and IgM were derived from normal human serum.

ナル抗体を用い、これら各抗体のヒト免疫グロブリンisotype との特異性は表1に示す如くであった。検体のELISA抗体陽性は、シヨ糖密度勾配による精製RSVに対するELISAのO. D. 値が、同様に作製したRSV非感染培養細胞(Hep-2)を対照抗原とした場合のO. D. 値の2倍以上の値を示すものとし、ELISA抗体価は、抗体陽性を示す検体の最高希釈の逆数をもって表現した。

結 果

鼻腔洗浄液中には、IgG1、G3、G4、IgA抗RSV抗体が検出されたが、IgG2、IgE抗体は検出されなかった。鼻アレルギー群、対照群とで比較してみると表2の如く、IgG1、G3、G4では両群とも同様のELISA抗体価を示すが、IgA抗体は鼻アレルギー群に高値を呈す傾向があった(但し、有意差は明らかでなかった)。

表 2 鼻腔洗浄液中抗RSV抗体 (ELISA titer ± SE)

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgE	IgA
鼻アレルギー群	7.75 ± 0.36	ND	1.75 ± 0.10	1.08 ± 0.09	ND	43.0 ± 1.61
対照群	6.12 ± 0.46	ND	0.86 ± 0.13	0.59 ± 0.07	ND	16.24 ± 1.47

ND : not detected

表 3 Effect of T-cell Depletion on RSV IgG1 Antibody Synthesis in TL Cultures

Stimulants	RSV IgG1 ELISA titer (± SE)*		
	Whole	TL	TL T-cell depleted
I-RSV	19.2 ±	5.1 ^{§1}	2.4 ± 0.7 ^{§2}
PWM	8.0 ±	1.1 ^{§§1}	1.6 ± 0.4 ^{§§2}
Control	3.2 ±	0.7	< 1.0

* expressed as reciprocal of dilution number tested are five

§1 vs §2, §§1 vs §§2 p < .01

図 1

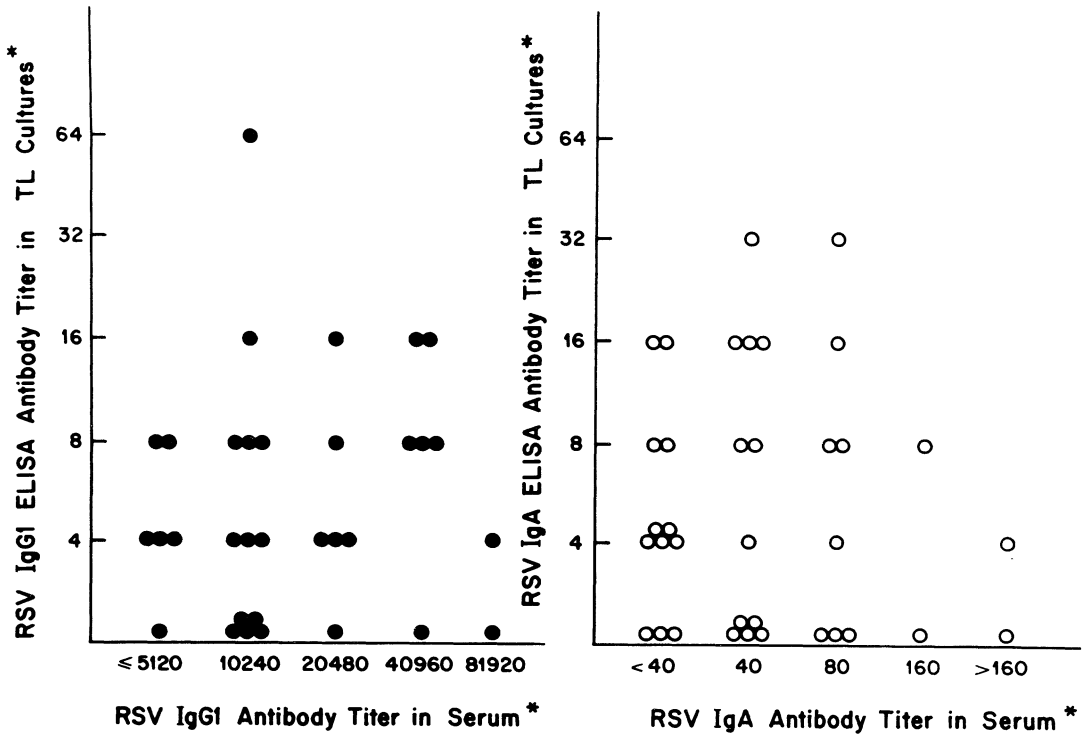


表 4 Comparison of RSV Antibody Synthesis in TL Obtained from Non-atopic and Atopic Subjects

Isotype	Non-atopic	Atopic	p. value	
IgG1	$\frac{\text{No. positive}}{\text{No. tested}}$	$\frac{23}{30}$	$\frac{7}{9}$	NS**
	antibody titer*	12.6 ± 0.3	14.7 ± 2.2	NS
IgG3	$\frac{\text{No. positive}}{\text{No. tested}}$	$\frac{2}{30}$	$\frac{1}{9}$	NS
	antibody titer	0.3 ± 0.5	0.4 ± 1.3	NS
IgA	$\frac{\text{No. positive}}{\text{No. tested}}$	$\frac{15}{30}$	$\frac{8}{9}$	< 0.01
	antibody titer	4.5 ± 0.2	12.9 ± 1.3	< 0.01

* expressed as reciprocal of dilution (mean \pm SE)

** not significant

次に、扁桃リンパ球を用いたin vitro抗体産生では、 $2 \sim 10^{-6}$ PFU濃度のRSV抗原刺激でIgG1、G3、IgA抗RSV抗体産生を認めた。しかし、IgG2、G4、IgE抗体産生は確認されなかった。扁桃リンパ球から抗人F(ab')₂免疫グロブリン抗体を用いたアフィニティークロスグラフィーにより、T細胞を除いたB細胞rich TL fractionsを作製して同様にその抗RSV抗体産生をみると、表3に示す如くT細胞を除くことで抗体産生は低下し、このin vitro抗体産生はT細胞依存性であると考えられた。

次に、扁桃摘出時の血中抗RSVIgG1、IgA抗体価と、扁桃リンパ球を用いたin vitroでの抗RSV抗体産生との関連をみてみると、図1に示すが、全く相関は認められなかった。

In vitro 抗体産生について、気管支喘息、鼻アレルギー、アトピー性皮膚炎、あるいは高IgE血症 (>400 IU/ml) を持つアトピー症例群と、健康非アトピー群について比較検討すると、表4に示すように、IgG1、G3抗RSV抗体は、両群にその産生に差を認めないが、IgA抗体は有意にアトピー群で、その産生頻度・抗体価ともに高値を呈した。

まとめ・考察

1. 鼻腔洗浄液中には抗RSVIgG1、G3、G4、IgA抗体が認められたが、IgG2、IgE抗体は確認出来なかった。
2. 鼻腔洗浄液中のIgA抗体は、鼻アレルギー群において対照群に比べ高値を示す傾向があった。
3. 扁桃リンパ球を用いたin vitroの抗RSV抗体産生において、IgG1及びIgA抗体と微量のIgG3抗体が認められた。
4. このことは、粘膜局所リンパ組織がIgAと同様にIgG1産生に関与していることを示し、この産生はT細胞依存性であった。
5. 扁桃培養上清中の抗RSV抗体価と、血

中抗RSV抗体価に相関は認められず、このことは、粘膜での感染は血中抗体価よりも局所での抗体産生により関連を持つと推察される。

6. アレルギー症例の扁桃培養上清中には、対照群に比べ有意に高い抗RSVIgA活性が認められ、これら亢進した局所でのIgA抗体産生は抗原の吸収を防ぐための代償性の働きを示唆するものかもしれない。

文 献

- (1) Okamoto Y, Tsutsumi H et al : Effect of breast feeding on the development of anti-idiotypic antibody response to F-glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Immunol* 142 : 2507-2512. 1989.
- (2) Henderson F W, Collier A M et al : A longitudinal study of respiratory viruses and bacteria in the etiology of acute otitis media with effusion. *N Eng J Med* 306 : 1377- 1383. 1982.
- (3) Welliver RC, Kaul A et al : The development of respiratory syncytial virus-specific IgE and the release of histamine in nasopharyngeal secretions after infection. *N Eng J Med* 305 : 841-847. 1981.
- (4) Freiherst J, Piedra F A et al : Effect of respiratory syncytial virus infection on the uptake of and immune response to other inhaled antigens. *Pro Soc Exp Bio Med* 188 : 191-197. 1988.
- (5) Okamoto Y, Brodsky L et al : Characteristics of in vitro production of mucosal antibody to respiratory syncytial virus in tonsillar tissue lymphocytes. *Clin Immunol and Immunopath* 49 : 299-307. 1988.

質 疑 応 答

質問 茂木五郎（大分医大）

- 1) 扁桃が粘膜抗体産生細胞のoriginであるかどうか。
- 2) なぜアトピー患者でRSV抗体が高いのか。

応答 岡本美孝（国立水戸）

- ① 扁桃細胞が、中耳粘膜も含めて局所免疫応答においてprecursor としての働きを持つ可能性はあると考えられる。
- ② アトピー群においてIgA産生が高い理由については不明だが、抗原のuptakeを防ぐ代償性の機能があるのかもしれない。