

IgG レセプターを介する好塩基球の 活性化機構に関する研究

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

河 田 典 子

(平成5年11月15日受稿)

Key words : KU812-F, Basophil, Ca²⁺ response, FcγRII, IgG antibody

緒 言

好塩基球・肥満細胞系には、I型アレルギー反応に関与するIgEレセプターが存在し、IgE抗体を介したレセプターのcross-linkingにより化学伝達物質が遊離されて、種々のアレルギー疾患を惹起することはよく知られている。しかしながら、本細胞系はIgEによるアレルギー反応のみならず、成人の非アトピー型喘息の病態への関与が指摘されており、広くアレルギー反応全般に関係していることが推定され¹⁾、IgE系以外の機序によるアレルギー反応についての解明が必要と考えられる。

教室の木村ら^{2,3)}、小林⁴⁾は、血清IgE低値の気管支喘息患者の好塩基球が、anti-IgGに反応して形態変化を示すことに注目し、続いて木村ら⁵⁾、松岡⁶⁾は、免疫走査電顕法を用いて気管支喘息患者の好塩基球上に結合したIgG抗体を半定量することによりIgGレセプターの動態を分析し、非アトピー型の喘息患者では好塩基球がIgG抗体を介してアレルギー反応に関与している可能性を報告した。

さらに最近、IgGレセプターには3つのサブタイプFcγRI (CD64)、FcγRII (CD32w)、FcγRIII (CD16)が存在することが明らかにされ、各々に対するモノクローナル抗体との反応から、細胞表面上のFcγレセプターの同定が可能になったことより⁷⁾、教室の高橋ら⁸⁾は、好塩基球上のIgGレセプターをflow cytometry (FCM)を用いて分析し、好塩基球細胞表面上のFcγRIIの選択的発現を証明した。加えて、

抗IgG₁、抗IgG₄モノクローナル抗体を用いて、喘息患者の好塩基球表面上にIgG₁、IgG₄が結合していることも明らかにし、気管支喘息患者の病態にIgG抗体が何らかの役割を果たしている可能性を示唆した。

このように、IgGを介した好塩基球の反応は非アトピー型喘息のメカニズムを解明する上で重要と考えられるが、好塩基球はその絶対数が極めて少数であるため、実験に際しては種々の制限を伴わざるを得ない。そこで今回著者は、末梢血好塩基球の代わりに、最近本邦で樹立されたヒト好塩基球性白血病細胞株KU812⁹⁾を用い、IgGレセプターを介した刺激によって、細胞内情報伝達がどのように行われているかを、細胞内Ca²⁺濃度の変化を指標として分析し、併せてヒスタミン遊離についても検討したので報告する。

材 料 と 方 法

1. 細 胞

実験には、慢性骨髄性白血病患者末梢血より樹立された細胞株KU812のsubcloneであるKU812-F (理化学研究所より供与)を使用した。10% fetal calf serum (FCS)を含むRPMI 1640 (Gibco社)を細胞培養液として用い、細胞濃度1-2×10⁶/ml、5%CO₂、37℃で培養し、3日毎に培養液を交換した。

2. 方 法

1) KU812-F 細胞表面上の免疫グロブリンレセプター発現の検討

① IgG レセプター

細胞を PBS で洗浄後, 0.1% BSA を含む PBS (BSA-PBS) に 1×10^6 /ml 濃度で浮遊させ, モノクローナル抗体と反応させるため 0.2 ml ずつ 5 本の tube に分注した. まず 1 本の tube に抗 Fc γ R I モノクローナル抗体である FITC 標識 32.2 (20 μ g/ml, Medarex 社) を, さらに別の tube に抗 Fc γ R III モノクローナル抗体である FITC 標識 Leu 11 a (50 μ g/ml, Becton-Dickinson 社) を加え, Fc γ R I, Fc γ R III の発現を検討した. なお, FITC 標識 mouse IgG₁ (20 μ g/ml, Becton-Dickinson 社) を加えた tube を control として用い, これらの tube を各々氷上で 30 分間反応させ, PBS で 2 回洗浄した後再浮遊させた. また Fc γ R II については, 抗 Fc γ R II モノクローナル抗体である 2 E1 (20 μ g/ml, Immunotech 社) 並びに control として mouse IgG_{2a} (20 μ g/ml, Becton-Dickinson 社) を氷上で 30 分間反応させた後 PBS で 2 回洗浄し, 再度 BSA-PBS に浮遊させ, 二次抗体として FITC 標識 goat F (ab')₂ anti-mouse IgG (GAM, Tago 社) を 40 μ g/ml の濃度で浮加して氷上で 30 分間反応後, 洗浄し PBS 0.5 ml に再浮遊させた. 以上の検体を, FACStar (Becton-Dickinson 社) で分析した.

② IgE レセプター

RPMI 1640 (10% FCS 加) に 1×10^6 /ml 濃度で浮遊させた細胞に human IgE (25 μ g/ml, Japan Immuno-monitoring Center) を加えて 37°C, 4 時間 incubate した後洗浄し, PBS に再浮遊させ, FITC 標識 anti-IgE (10 μ g/ml, Tago 社) を添加して氷上で 30 分間反応させてから洗浄し, FACStar で分析した. なお, human IgE を加えない細胞に, FITC 標識 anti-IgE を添加して反応させたものを control として用いた.

2) 細胞内 Ca²⁺濃度の測定

fluo-3 (Dojindo 社) は, 励起波長 500 nm, 最大蛍光波長 520 nm と FCM の argon laser (488 nm) での検出に適しており, acetoxymeth-

ylester 化の形 (fluo-3/AM) で容易に細胞内に取り込まれ, Ca²⁺と結合すると蛍光強度が 40 倍に増強され, しかも Ca²⁺との親和性が低いことより, 細胞内 Ca²⁺濃度の変化を捉えやすいため^{10, 11)}, calcium indicator として使用した.

細胞 (2×10^6 /ml) を HBSS に浮遊させ, fluo-3/AM 2 μ M を加え, 暗所, 室温で 40 分間反応させて 2 回洗浄し, HBSS (Ca²⁺, Mg²⁺を含む) に再浮遊させ 37°C で 10 分間 incubate した後, 各種刺激を加えて 30 分以内に FACStar で分析した. IgG レセプターを介する刺激として Aggregated human IgG (Agg-IgG) を用いたが, これは実験の度に chromatographically purified human IgG (Zymed 社) を 63°C, 60 分間熱処理を加えた後 10000 \times g, 10 分間遠沈し large aggregates を除去して作成したものを使用した. なお, fluo-3 の蛍光測定は 525 nm (FL-1) band pass filter を通して linear scale で分析し, 経時的に 5000 個の細胞の mean fluorescence を求めた.

細胞内 Ca²⁺濃度の較正のため, Bromo-A 23187 (10 μ M, Molecular Probes 社) 添加時の値を最大値 F max とし¹²⁾, MnCl₂ を添加したときの値より, 最小値 F min を算出した¹³⁾. これらの値より, 下記の式を用いて細胞内 Ca²⁺濃度を求めた¹⁴⁾.

$$[Ca^{2+}]_i \text{ (nM)} = Kd (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

F: 検体の mean fluorescence

$$F_{min} = F_{max} - (F_{max} - F_{MnCl_2}) \times 1.25$$

$$Kd = 400 \text{ nM (fluo-3 の解離定数)}$$

なお, 較正は実験検体ごとに行った.

4) ヒスタミン遊離率の検討

HBSS (Ca²⁺, Mg²⁺を含む) に, 細胞を 1×10^5 /ml 濃度で浮遊させ, IgG レセプターを介する刺激並びに非生理的的刺激物質として Calcium ionophore (A23187, 1 μ g/ml) を加えて 37°C, 45 分間 incubate したのち, 4°C, 400 \times g で 10 分間遠心し, 上清中のヒスタミンを RIA (Immunotech 社) で測定した¹⁵⁾. また, human IgE (25 μ g/ml) を加えて 4 時間 incubate した細胞を HBSS に浮遊させ, anti-IgE を添加し上記と同様にして反応させた. 刺激物質の代わりに HBSS を加え同様に incubate して得られ

たものを自然遊離量として求め、全ヒスタミン量は細胞浮遊液を100℃、10分間熱処理したものを遠沈後、上清を測定に供した。RIA法による測定はすべて duplicate で行い、ヒスタミン遊離率は、下記の式により算出して求めた。なお、自然遊離量は全ヒスタミン量の10%以下であった。

$$\text{ヒスタミン遊離率 (\%)} = \frac{\text{刺激による遊離量} - \text{自然遊離量}}{\text{全ヒスタミン量} - \text{自然遊離量}} \times 100$$

次に、ヒスタミン遊離を増強させる目的で recombinant human interleukin-3 (rhIL-3, Genzyme 社) を100 U/mlの濃度で加えて10分間 preincubate した後¹⁶⁾、刺激物質を添加してヒスタミン遊離を検討した。

結 果

1. KU812-F の免疫グロブリンレセプター発現について

KU812-F の細胞膜表面上には、FcγRI、FcγRIIIはごく僅かな発現か、あるいはほとんど発現が認められなかったのに対して、FcγRIIでは Fig. 1A に示す如く明かな発現がみられ、IgG レセプターに関して FcγRII の選択的な発現を示したヒト末梢血好塩基球と同様の結果であった^{17, 18)}。

一方 IgG レセプター (Fig. 1B) については、FcγRII のような明瞭な発現ではなく、軽微な発現であった。

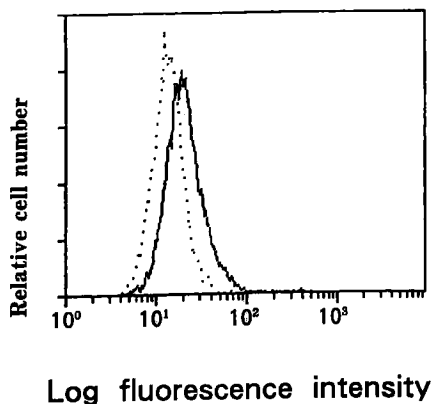
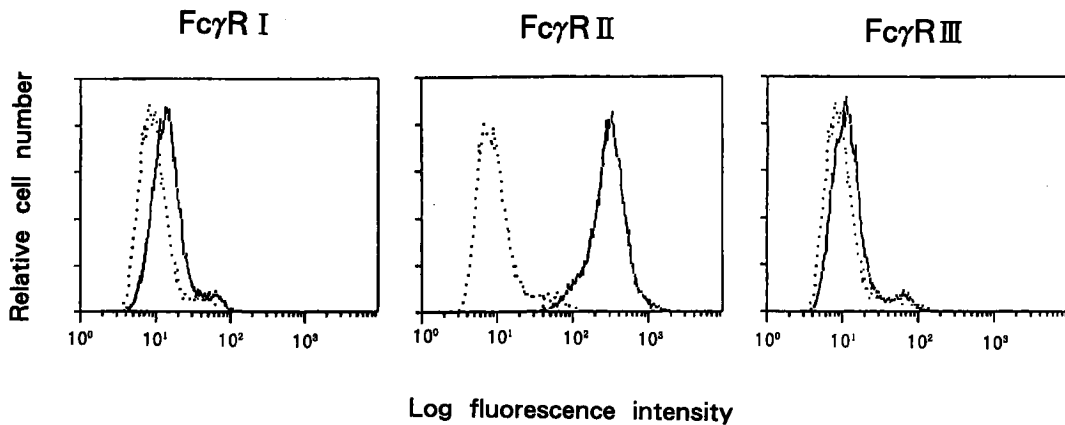


Fig. 1 KU812-F における免疫グロブリンレセプター発現の検討

A(上) : IgG レセプター

FcγRII では、control (...) に比べて蛍光強度に顕著な差を認め、同レセプターの明かな発現がみられた。

B(左) : IgE レセプター

2. Agg-IgG 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の動態分析

1) 時間的経過

まず、刺激前の細胞内 Ca^{2+} 濃度を 1×10^4 個の KU812-F 細胞について測定し、続いて種々の濃度 (100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$) の Agg-IgG で刺激して 5–10秒ごとに 5000個測定した。また control として HBSS を添加した細胞について同様の検定を行った。その結果、Fig. 2 に示す如く Agg-IgG 刺激では control に比し添加後 30–40秒で細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がみられ、1分30秒–2分後にピークに達し、その後徐々に低下して10分前後で元の濃度に復し、しかも Agg-IgG の容量依存性に増強される傾向が認められた。なお、Agg-IgG 500 $\mu\text{g/ml}$ で刺激した場合、ピーク時の細胞内 Ca^{2+} 濃度は刺激前の 1.4 ± 0.16 倍 (mean \pm SD, $n = 13$) に達した。

2) 細胞外カルシウムの影響

細胞外からの Ca^{2+} の流入を遮断する目的で細胞浮遊液に 2.5mM の Ethyleneglycol-bis- (2-aminoethyl) -tetraacetate (EGTA) を加えて処理した後、Agg-IgG で刺激し、EGTA を加えていない対照群と比較した。その結果、Fig. 3 の如く刺激後には対照群と同様 30–40秒で細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がみられたが、上昇のピークは低く、しかも 3分以内に元のレベルに戻った。この短時間の僅かな上昇は、細胞内の貯蔵カルシウムからの放出によるものと考えられた。

3) 細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇における $Fc\gamma RII$ を介する関与

KU812-F細胞膜表面上に $Fc\gamma RII$ の選択的な発現が認められたことより、かかる受容体を介する刺激で細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が起こりうるか否かを、Agg-IgG を用いて検討した。まず、 $Fc\gamma RII$ への human IgG の結合を遮断する抗 $Fc\gamma RII$ モノクローナル抗体 IV.3 (Medarex 社) を用いて、Agg-IgG 刺激と $Fc\gamma RII$ の結合の特異性をみた。すなわち fluo-3/AM で処理した細胞浮遊液に IV.3 Fab (10 $\mu\text{g/ml}$) を添加し、続いて Agg-IgG (500 $\mu\text{g/ml}$) で刺激したところ、Fig. 4 に示すように細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は検出されなかった。従って、IV.3 によって Agg-IgG の刺激伝達は完全に遮断されることが判明した。

次に、 $Fc\gamma RII$ を cross-link させた際の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化について検討した。まず、前記の IV.3 を細胞浮遊液に加えて 4 $^{\circ}\text{C}$ 、30分間 incubate して洗浄処理した細胞に goat anti-mouse IgG (GAM, Tago 社) 25 $\mu\text{g/ml}$ を添加したところ、Fig. 5 に示す如く細胞内 Ca^{2+} 濃度

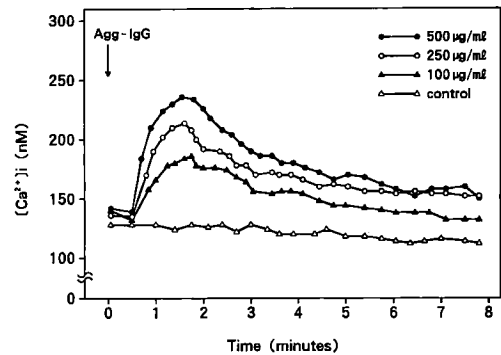


Fig. 2 各種濃度の Agg-IgG で刺激したときの細胞内 Ca^{2+} 濃度の経時的変化

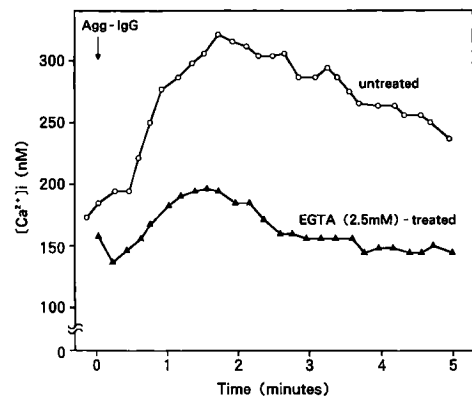


Fig. 3 EGTA 存在下での Agg-IgG で刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化

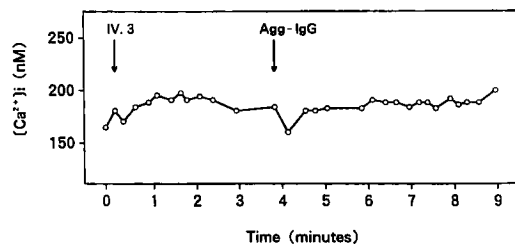


Fig. 4 Agg-IgG で刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化に及ぼす抗 $Fc\gamma RII$ 抗体 IV.3 の影響

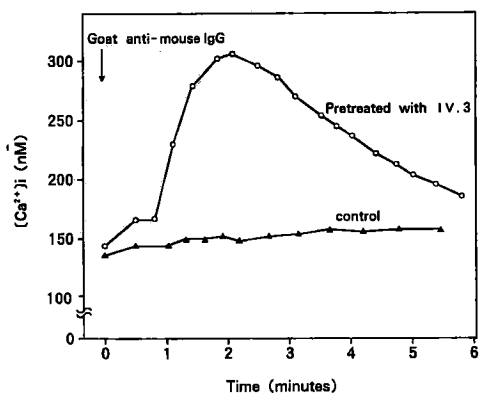


Fig. 5 抗 Fc γ RII 抗体 IV.3 を Goat anti-mouse IgG で cross-link させたときの細胞内 Ca²⁺濃度の変化

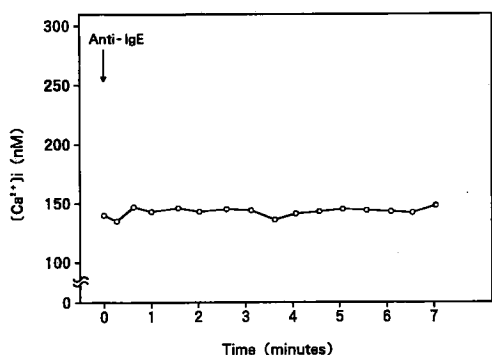


Fig. 6 Human IgE で preincubate した後, Anti-IgEで刺激したときの細胞内 Ca²⁺濃度の変化

は30—40秒後に急峻な上昇を示し、ピークも刺激前の 3.05 ± 0.45 倍 (mean \pm SD, $n = 5$)と著しい変化が認められた。

3. IgE 刺激による細胞内 Ca²⁺濃度の動態

human IgE (25 μ g/ml) で4時間 preincubate した細胞に fluo-3/AM を同様にして取り込ませた後, anti-IgE (20 μ g/ml) を添加して細胞内 Ca²⁺濃度を測定したが, Fig. 6 の如く同刺激による細胞内 Ca²⁺濃度に変化は認められなかった。

4. ヒスタミン遊離

各種刺激による本細胞のヒスタミン遊離について検討したところ, Table 1 の如く A23187 による刺激では $28.6 \pm 4.7\%$ と有意なヒスタミン遊離が見られたのに対して, Agg-IgG 刺激では100, 250, 500 μ g/ml の各種濃度で刺激しても有意なヒスタミン遊離は認められなかった。

次に, IV.3 (10 μ g/ml) を加えて incubate し洗浄後, 二次抗体 GAM (25 μ g/ml) を添加して Fc γ RII を cross-link させた際 (IV.3 + GAM) のヒスタミン遊離を検討したが, 細胞内 Ca²⁺濃度の著しい上昇にも拘らず, ヒスタミン遊離は10%以下であった。

また, human IgE で preincubate した細胞を anti-IgE (0.2—2 μ g/ml) で刺激しても有意なヒスタミン遊離はみられなかった。

さらに, rhIL-3 を添加して preincubate した後同様の刺激を加えて検討したところ, A23187 ではヒスタミン遊離の増強がみられたが, IgG レ

Table 1 各種刺激による KU812-F からのヒスタミン遊離率の検討

Stimulus	Concentration	% Histamine release	% Histamine release
			Preincubated with rhIL-3 (100 U/ml)
A23187	1 μ g/ml	28.6 ± 4.7	33.2 ± 3.5
Agg-IgG	100 μ g/ml	2.2 ± 1.3	2.3 ± 1.2
	250 μ g/ml	2.6 ± 1.3	2.5 ± 1.0
	500 μ g/ml	4.3 ± 1.7	4.7 ± 1.5
IV.3 + GAM*		1.5 ± 0.7	1.7 ± 0.5
Anti-IgE	0.2 μ g/ml	2.0 ± 1.1	N.D.
	2.0 μ g/ml	1.6 ± 0.5	N.D.

Mean \pm SD N.D. = Not Done

*Goat anti-mouse IgG

($n = 3$)

セプターを介する刺激ではヒスタミン遊離の増強は認められなかった。

考 察

好塩基球は IgE を介する I 型以外のアレルギー反応にも関与することが想定されていることから、本編では IgG を介した好塩基球の活性化機構を解明する目的で、ヒト好塩基球性白血病細胞株 KU812-F を用いて、細胞表面上の IgG レセプターの発現、並びにかかるレセプターを介した細胞の活性化を細胞内 Ca^{2+} 濃度の動態分析、及びヒスタミン遊離能の観点から検討を加えた。その結果、KU812-F には末梢血好塩球と同様、Fc γ RII の選択的発現が認められ、さらに同レセプターを介する刺激によって、細胞内 Ca^{2+} 濃度の明らかな上昇がみられたが、ヒスタミン遊離は認められず、好塩基球においても IgG レセプターがヒスタミン遊離以外の細胞活性化に関与していることが判明した。

今回検討を加えた KU812-F は、慢性骨髄性白血病患者の末梢血より樹立された細胞株で、芽球の形態をとり、一部にトルイジンブルーに異染性を示す好塩基球顆粒を持ち、ヒスタミンの含有も認められている⁹⁾。また、好塩基球と類似の表面抗原を有し^{19, 20)}、特に IgE レセプターについては、高親和性 IgE レセプターである Fc ϵ R I の α サブユニットがクローニングされており²¹⁾、好塩基球系への分化の可能性が示唆されている。今回 flow cytometry を用いて IgG レセプターのサブタイプを検討した結果、ヒト末梢血好塩基球と同様、Fc γ RII の選択的発現が認められ^{17, 18)}、IgG を介する好塩基球の刺激伝達を検討する上で有用なモデルと考えられた。

Fc γ RII は、40 kDa の分子量をもつレセプターで、単球、好中球、好酸球、B リンパ球など幅広く白血球に存在するほか、血小板上にも発現が認められているが、IgG に対する親和性が低いため monomeric IgG はほとんど結合せず、免疫複合体や多価の IgG のみ結合するという性質をもっている^{22, 23)}。今回 Agg-IgG を用いて IgG の刺激伝達機構の検討を行ったところ、刺激後速やかに細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がみられた。さらに、EGTA を用いた実験結果より、刺激直

後の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇にはある程度細胞内の貯蔵カルシウムからの放出が関与しているが、より高度の濃度上昇並びに持続に関しては細胞外からのカルシウムの流入が必要と考えられた。

また、抗 Fc γ RII 抗体である IV.3 によって Agg-IgG による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が完全にブロックされたことから、細胞内シグナル伝達は Fc γ RII を介して起こっていることが確認された。さらに、IV.3 の単独刺激では細胞内 Ca^{2+} 濃度は変化しなかったのに対し、IV.3 で処理した細胞に二次抗体を加えて Fc γ RII を cross-link させると、細胞内 Ca^{2+} 濃度が著明に上昇したことより、Agg-IgG は Fc γ RII に単に結合するだけでなく、レセプターの clustering を惹起し、それによって、細胞の活性化が誘導されるものと推察された。以上の結果は、生体内においても好塩基球が免疫複合体などによって刺激を受け、IgG レセプターを介して細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を初めとする細胞の活性化が起こる可能性を示唆しているものと思われた。

従来より IgE レセプターを介した細胞の活性化機構については、好塩基球・肥満細胞系を中心に研究が行われており、Fc ϵ R I の cross-linking によって、イノシトールリン脂質代謝の亢進、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が起こり、ヒスタミンなど種々の化学伝達物質が遊離されることが明らかにされているが、IgG レセプターに関しても、近年、様々な細胞における Fc γ R サブタイプの同定、並びにそれらを介したシグナル伝達機構の解明が行われている。

Fc γ RII、Fc γ RIII の 2 種類の IgG レセプターを持つ好中球では、細胞活性化に際して両レセプター間での協同作用が報告されており²⁴⁾、また血小板のように Fc γ RII のみの発現が認められている細胞では、Fc γ RII の cross-linking によって、イノシトールリン脂質代謝の亢進、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が起こり、最終的に血小板凝集が引き起こされることが認められている²⁵⁾。

今回の KU812-F の実験系でも、Fc γ RII の cross-linking により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、細胞内シグナル伝達が行われていることが確認されたが、かかるシグナルがいかなる機序で細胞を活性化し、どのような化学伝達物質を産生・

放出しているかを検討していく必要がある。例えば好塩基球の IgE レセプターを cross-link させたときにみられるヒスタミン遊離がこの場合にも認められるのか否かは、IgG 抗体による好塩基球の活性化を考える上で大変興味深い問題である。KU812-F のヒスタミン含有量は、ヒト好塩基球に比し少量であるが^{18, 19)}、A23187, PMA などの非生理的的刺激によってヒスタミンが遊離することが認められており¹⁹⁾、今回の実験でも、A23187 による明らかなヒスタミン遊離がみられた。しかしながら、Agg-IgG を添加した場合、並びに IV.3 を結合させ二次抗体で cross-link させた場合のいずれにおいてもヒスタミンは遊離せず、IgE レセプターを介する刺激では有意なヒスタミンの遊離は認められないという結果であった。

従来から IgG 抗体による好塩基球・肥満細胞系からのヒスタミン遊離については、動物の種類によって差のあることが知られている。例えば、モルモット、マウスの肥満細胞では、IgG₁ 抗体によるヒスタミン遊離が FcγR を介して起こっていることが確認されているが、ヒトにおいてはもとより異論のあるところであり、未だに一定の知見がえられていない。1970年 Parish²⁶⁾が、即時型反応を起こすヒト IgG の存在を示し、IgG short-term sensitizing antibody (IgG-STS) の概念を提唱して以来、anti-IgG によってヒト好塩基球からのヒスタミン遊離がみられたとする実験結果が相次いで出された^{27, 28, 29)}。特にモノクローナル抗体を用いた実験で、anti-IgG₄ 抗体により好塩基球からヒスタミン遊離が認められたとする報告が複数の研究者から出され、IgG₄ 抗体と I 型アレルギーとの関連が目されるようになった^{28, 29)}。一方これとは逆に、IgG 抗体は好塩基球に固着し得ず、ヒスタミン遊離は起こらないとする報告もいくつかみられ^{30, 31)}、また、anti-IgG によるヒスタミン遊離の機序についても不明な点が多く、まだ仮説の域を出ていないのが現状である。Ishizaka ら³²⁾は、ラジオアイソトープを用いた実験で、好塩基球には monomeric IgG は結合せず、Agg-IgG などの多価 IgG のみ結合しうるが、Agg-IgG が結合してもヒスタミン遊離は起こらないことを報告

している。さらに、Lichtenstein ら³³⁾はアトピー患者及び健常者の好塩基球と血清を用いて実験を行い、anti-IgG によるヒスタミン遊離は、IgE に対する自己抗体 (IgG) を介して間接的に好塩基球上の IgE レセプターを cross-link した結果起こったものである可能性が強く、FcγR II の関与は考えにくいとしている。KU812-F 細胞の FcγR II を介する刺激で細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がみられたにも拘らずヒスタミン遊離が起こらなかったという今回の実験結果は、Lichtenstein らの見解を裏付けるものと考えられ、好塩基球において、FcγR II を介した anti-IgG によるヒスタミン遊離の機序を想定することは、些か困難があると思われる。ただし、KU812-F 自体未熟な細胞であり、IgE レセプターの明らかな発現がみられないため、それを介する刺激伝達を確認することができなかったことを考えると、脱顆粒に至るシグナル伝達機構が未成熟である可能性も否定できず、今後、細胞を分化成熟させ、IgE レセプターを増加させた段階での検討が必要と思われる。

また、FcγR II を介する刺激がヒスタミン遊離に直接関与していないとしても、産生機構の異なる他の化学伝達物質、あるいはサイトカインの放出に関与する可能性が想定される。実際、好塩基球と同じく FcγR II の選択的発現が認められている好酸球では、IgG 刺激でロイコトリエンの産生が報告されており³⁴⁾、またマウスの脾臓、骨髄由来の細胞を用いた実験で、好塩基球・肥満細胞系と考えられる FcεR I 陽性細胞の FcγR II を IgG 抗体で cross-link させると、IL-4 が産生されるとの報告もみられる³⁵⁾。今後、IgG 刺激による好塩基球の活性化機構解明の一助として、KU812-F でのこれらの化学伝達物質、サイトカインを含めた幅広い細胞活性化の検討が必要と思われる。

結 論

IgE 以外のアレルギー反応における好塩基球の役割を解明する研究の一環として、IgE レセプターを介する細胞の活性化機構を明らかにする目的で、ヒト好塩基球性白血球細胞株 KU812-F を用いて検討し、以下の結果を得た。

1) KU812-Fには、ヒト末梢血好塩基球と同様、IgG レセプターのサブタイプの一つである Fc γ RIIの明らかな発現が認められた。

2) KU812-Fを Agg-IgGで刺激すると、細胞内 Ca²⁺濃度の有意な上昇がみられた。この上昇は抗 Fc γ RII抗体 IV.3によって阻止され、また IV.3を加えた後、二次抗体で cross-link させると著明な細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が認められた。

3) KU812-Fに IgG レセプターを介する刺激を加えても、有意なヒスタミン遊離は認められなかった。

以上の結果より、KU812-Fでは Fc γ RIIの cross-linkingによって細胞内シグナル伝達が行われ、何らかの細胞の活性化が起こっていると推察され、IgG レセプターを介する好塩基球の機能発現を考える上で示唆に富む重要な所見であると思われた。

稿を終えるにあたり、終始御指導御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表すると共に、直接御指導戴いた高橋 清講師に深謝いたします。

(本論文の要旨は第42回アレルギー学会総会にて発表した。)

文 献

- 1) Kimura I, Tanizaki Y, Sato S and Takahashi K : Differences in response to anti-IgE and to anti-IgG in basophils from patients with bronchial asthma. *Clin Allergy* (1981) 11, 31-36.
- 2) 木村郁郎, 谷崎勝朗, 高橋 清 : 気管支喘息における抗免疫グロブリンに対する好塩基球の反応性について—抗ヒト IgG に対する反応性からみた分類の可能性—. *アレルギー* (1976) 25, 70-75.
- 3) 木村郁郎, 谷崎勝朗, 佐藤周一, 高橋 清, 上田暢男, 斉藤勝剛 : In vitro 免疫下における好塩基球の生態観察—気管支喘息患者の抗ヒト IgG に対する反応性—. *アレルギー* (1976) 25, 489-492.
- 4) 小林 誠 : 免疫反応下における好塩基球の形態学的研究 第2編 抗ヒト免疫グロブリンによる好塩基球の形態学的変化の免疫走査電子顕微鏡観察. *岡山医誌* (1979) 91, 749-761.
- 5) Kimura I, Takahashi K, Soda R, Kishimoto T and Matsuoka T : Basophils immunoglobulin receptors in asthmatics under immuno-scanning electron microscopy. *Clin Allergy* (1985) 15, 9-15.
- 6) 松岡 孝 : 気管支喘息患者好塩基球の免疫グロブリンレセプターと IgG 抗体の作用機序に関する研究 第1編 重症難治性喘息における IgG 抗体の役割に関する検討. *岡山医誌* (1979) 98, 525-535.
- 7) Huzinga TWJ, Roos D and Von dem Borne AEGKr : Neutrophil Fc γ Receptors : A two-way bridge in the immune system. *Blood* (1990) 75, 1211-1214.
- 8) Takahashi K, Takata M, Suwaki T, Kawata N, Tanimoto Y, Soda R and Kimura I : New flow cytometric method for surface phenotyping basophils from peripheral blood. *J Immunol Methods* (1993) 162, 17-21.
- 9) Kishi K : A new leukemic cell line with Philadelphia chromosome characterized as basophil precursors. *Leuk Res* (1985) 9, 381-390.
- 10) Minta A, Kao JPY and Tsien RY : Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine fluorescein chromophores. *J Biol Chem* (1989) 264, 8171-8178.
- 11) Kao JPY, Harootunian AT and Tsien RY : Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J Biol Chem* (1989) 264, 8179-8184.
- 12) Deber CM, Tom-Kun J, Mack E and Grinstein S : Bromo-A23187 : a non fluorescent calcium ionophore for use with fluorescent probes. *Anal Biochem* (1985) 146, 349-352.
- 13) Hesketh TR, Smith GA, Moore JP, Taylor MV and Metcalfe JC : Free cytoplasmic calcium concentration and the mitogenic stimulation of lymphocytes. *J Biol Chem* (1983) 258, 4876-4882.

- 14) Vandenberghe PA and Ceuppens JL : Flow cytometric measurement of cytoplasmic free calcium in human peripheral blood T lymphocytes with fluo-3, a new fluorescent calcium indicator. *J Immunol Methods* (1990) **127**, 197—205.
- 15) McBride P, Bradely D and Kaliner M : Evaluation of a radioimmunoassay for histamine measurement in biological fluids. *J Allergy Clin Immunol* (1988) **82**, 638—646.
- 16) Hirai K, Morita Y, Misaki Y, Ohta K, Takaishi T, Suzuki S, Motoyoshi K and Miyamoto T : Modulation of human basophil histamine release by hemopoietic growth factors. *J Immunol* (1988) **141**, 3958—3964.
- 17) Anselmino LM, Perussia B and Thomas L : Human basophil selectively express the $Fc\gamma R II$ (CDw 32) subtype of IgG receptor. *J Allergy Clin Immunol* (1989) **84**, 907—914.
- 18) Stain C, Stockinger H, Scharf M, Jaerer U, Goessinger H, Lechner K and Bettelheim P : Human blood basophils display a unique phenotype including activation linked membrane structures. *Blood* (1987) **70**, 1872—1879.
- 19) Fukuda T, Kishi K, Ohnishi Y and Shibata A : Bipotential cell differentiation of KU-812 : evidence of a hybrid cell line that differentiates into basophils and macrophage-like cells. *Blood* (1987) **70**, 612—619.
- 20) Valent P, Besemer J, Kishi K, Kaltenbrunner R, R, Kuhn B, Maurer D, Lechner K and Bettelheim P : IL-3 promotes basophilic differentiation of KU812 cells through high affinity binding sites. *J Immunol* (1990) **145**, 1885—1889.
- 21) Kochan J, Pettine LF, Hakimi J, Kishi K and Kinet JP : Isolation of the gene coding for the alpha subunit of the human high affinity IgE receptor. *Nucleic Acids Res* (1988) **16**, 3584.
- 22) Ravetch JV and Kinet JP : Fc Receptors. *Annu Rev Immunol* (1991) **9**, 457—492.
- 23) Van de Winkel JGJ and Anderson CL : Biology of human immunoglobulin receptors. *J Leukocyte Biol* (1991) **49**, 511—524.
- 24) Kimberly RP, Ahlstrom JW, Click ME and Edberg JC : The glycosyl phosphatidylinositol-linked $Fc\gamma III$ Rpmn mediates transmembrane signaling events distinct from $Fc\gamma R II$. *J Exp Med* (1990) **171**, 1239—1255.
- 25) Anderson GP and Anderson C : Signal transduction by the platelet Fc receptor. *Blood* (1990) **76**, 1165—1172.
- 26) Parish W : Short-term anaphylactic IgG antibodies in human sera. *Lancet* (1970) **2**, 590—592.
- 27) Grant JA and Lichtenstein LM : Reversed in vitro anaphylaxis induced by anti-IgG : specificity of the reaction and comparison with antigen-induced histamine release. *J Immunol* (1972) **109**, 20—25.
- 28) Nakagawa T, Stadler BM, Heiner DC, Skvaril F and DeWeck AL : Flow cytometric analysis of human basophil degranulation. II. Degranulation induced by anti-IgE, anti-IgG 4 and the calcium ionophore A23187. *Clin Allergy* (1981) **11**, 21—30.
- 29) Fagan DL, Slaughter CA, Capra JD and Sullivan TJ : Monoclonal antibodies to immunoglobulin G 4 induce histamine release from human basophils in vitro. *J Allergy Clin Immunol* (1982) **70**, 399—404.
- 30) Van Toorenbergen AW and Aalberse RC : IgG 4 and passive sensitization of basophil leukocytes. *Int Arch Allergy Appl Immunol* (1981) **65**, 432—440.
- 31) Devey ME and Panzani R : The IgG subclass antibodies to castor bean allergen in patients with allergic asthma : detection of a high incidence of antibodies of the IgG 4 subclass. *Clin Allergy*

- (1975) **5**, 353—361.
- 32) Ishizaka T, Sterk AR and Ishizaka K : Demonstration of $Fc\gamma$ receptors on human basophil granulocytes. *J Immunol* (1979) **123**, 578—583.
 - 33) Lichtenstein LM, Sobotka AK, White JM and Hamilton R.G : Anti-human IgG causes basophil histamine release by acting on IgG-IgE complexes bound to IgE receptors. *J Immunol* (1992) **148**, 3929—3936.
 - 34) Shaw RJ, Walsh GM, Cromwell O, Moqbel R, Spry CJF and Kay AB : Activated human eosinophils generate SRS-A leukotriens following IgG-dependent stimulation. *Nature* (1985) **316**, 150—152.
 - 35) Seder RA, Paul WE, Ben-Sasson SZ, LeGros GS, Sobotka AK, Finkelman FD, Pierce JH and Plaut M : Production of interleukin-4 and other cytokines following stimulation of mast cell lines and in vivo mast cells/basophils. *Int Arch Appl Immunol* (1991) **94**, 137—140.

**The mechanism of human basophil activation associated with IgG receptor :
Analysis of calcium mobilization in the human basophilic
leukemia cell line KU812-F**

Noriko KAWATA

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

To clarify the mechanism of human basophil activation via IgG receptors, calcium mobilization in response to IgG antibodies was analyzed in the human basophilic leukemia cell line KU812-F, using flow cytometry. KU812-F cells as well as human basophils selectively expressed the $Fc\gamma RII$ subtype of IgG receptor. After stimulation with aggregated IgG, an obvious increase in $[Ca^{2+}]_i$ was observed, but the increase was completely inhibited by IV.3 (anti $Fc\gamma RII$ mAb). Moreover, IV.3 elicited a $[Ca^{2+}]_i$ rise only when cross-linked on the cell surface with anti-mouse IgG. No significant histamine release was observed after any IgG stimulation and the biologic function of the $Fc\gamma RII$ -induced $[Ca^{2+}]_i$ rise remains unclear.

These findings suggest that the cross-linking of $Fc\gamma RII$ in KU812-F cells induces signal transduction events and initiates cell activation with the exception of histamine release, and human basophils also may be activated *in vivo* by IgG antibodies.