

活性化リンパ球の造血調節への関与：同種抗原刺激
リンパ球の顆粒球-
マクロファージ系前駆細胞に及ぼす影響

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9096

活性化リンパ球の造血調節への関与 同種抗原刺激リンパ球の顆粒球-マクロファージ系 前駆細胞に及ぼす影響

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 服部絢一教授)

中 尾 真 二

(昭和58年12月1日受付)

活性化リンパ球の造血調節への関与を明らかにするため、同種抗原で刺激を受けたリンパ球の顆粒球-マクロファージ系造血前駆細胞である colony forming unit in culture (CFU-C) に及ぼす影響を検討した。培養2~3日目の混合リンパ球培養 mixed lymphocyte culture (MLC) から得られた同種抗原刺激リンパ球を第三者由来の無関係な骨髓細胞と coculture した場合には CFU-C 数の有意な変化はみられなかった。一方、培養6~7日目および9~10日目の MLC から得られた同種抗原刺激リンパ球を第三者由来の骨髓細胞または自己の骨髓細胞と coculture した場合には、CFU-C 数は加える同種抗原刺激リンパ球に dose-dependent に減少した。この CFU-C の抑制は、MLC 培養6日目の同種抗原刺激リンパ球培養上清の添加によっても認められた。同種抗原刺激リンパ球の CFU-C に対する抑制活性は non-T 細胞中には認められず、T 細胞中のみ認められた。この CFU-C 抑制性細胞の性状を明らかにするため、同種抗原刺激リンパ球に 2000 rad の X 線照射かまたは T 細胞サブセットを認識するモノクローナル抗体と補体による処理を施した後骨髓細胞と coculture した。その結果、同種抗原刺激リンパ球の CFU-C 抑制性活性は OKT8 かまたは OKIa1 と補体の処理により完全に消失したが、X 線照射では消失しなかった。さらに、同種抗原刺激リンパ球のうち OKT8 陽性細胞を骨髓細胞と coculture した場合には CFU-C の有意な抑制が認められたが、同種抗原刺激 OKT4 陽性細胞や同種抗原非刺激 OKT4 陽性細胞および OKT8 陽性細胞との coculture では CFU-C に有意な変化は認められなかった。以上の成績から、MLC において同種抗原刺激により活性化されたリンパ球は CFU-C に対して抑制的に働き、その CFU-C 抑制性細胞は OKT8 および Ia 陽性の T 細胞であることが示唆された。

Key words Colony forming unit in culture (CFU-C), Mixed lymphocyte culture (MLC), T-cell subset, Monoclonal antibody

1961年 Till & McCulloch¹⁾によって開発されたマウス脾コロニー形成法を契機として造血幹細胞研究は急速に進歩し、その結果種々の成熟段階にある造血幹細胞を *in vitro* で定量的に測定することが可能になってきている。最近では、造血幹細胞の *in vitro* assay 法を利用して造血調節機構の解明が試みられており、そのメカニズムが次第に明らかにされつつある。特に近年、顆粒球-マクロファージ系前駆細胞である

colony forming unit in culture (以下 CFU-C と略) の分化、増殖に必要な colony stimulating activity (以下 CSA と略) が、主に単球や活性化されたリンパ球によって産生されていること²⁾³⁾や、一部の再生不良性貧血患者のリンパ球が造血幹細胞に抑制的に働いていること⁴⁾⁵⁾などが見出しされて以来、免疫担当細胞による造血幹細胞の分化、増殖の調節が注目を集めている。一方、免疫担当細胞の中でも特に T 細胞は、con-

Role of Activated Lymphocytes in the Regulation of Hematopoiesis: Effect of Alloantigen-Stimulated Lymphocytes on Granulocyte-Macrophage Progenitor Cells. Shinji Nakao, Department of Internal Medicine (III), (Director: Prof. K. Hattori) School of Medicine, Kanazawa University.

canavalin A (以下 Con A と略) のような mitogen や同種抗原などの刺激を受けることによって種々の免疫反応の調節に直接関与することが知られている^{6)~8)}。

われわれは、このような免疫反応に対して調節的作用を有する活性化 T 細胞が造血幹細胞の分化、増殖の調節にも関与している可能性を検討するため、まず、種々の suppressor cells を誘導することで知られている Con A で活性化された T 細胞の CFU-C 及び赤血球系前駆細胞である erythroid colony forming unit (以下 CFU-E と略) に及ぼす影響を検討した。その結果、Con A 刺激 T 細胞は CFU-C や CFU-E の分化、増殖に抑制的に働くことを見出し、その成績の一部は既に報告した⁹⁾¹⁰⁾。一方、Con A 刺激 T 細胞のみならず、混合リンパ球培養 (mixed lymphocyte culture, 以下 MLC と略) において同種抗原による刺激を受けた T 細胞も MLC を非特異的に抑制することが知られている⁹⁾。そこで、活性化リンパ球の造血調節への関与をさらに明らかにするため、同種抗原刺激リンパ球の CFU-C に及ぼす影響を coculture study を用いて検討した。

材料および方法

I. 骨髓単核細胞及び末梢血リンパ球の分離

健康な volunteer の腸骨後部よりヘパリン加骨髓液を 5 ml~10 ml 採取し、生理的食塩水で数倍に稀釈後、Ficoll-Hypaque 法により単核細胞を分離した。得られた骨髓単核細胞は α 培養液 (α -modified Eagle's minimal essential medium, Flow) にて 3 回洗浄後、20% 牛胎児血清 (fetal calf serum, 以下 FCS と略, Flow) 加 α 培養液に $3-5 \times 10^6$ /ml の濃度で浮遊させ、プラスチック培養皿 (60 \times 15 mm Falcon # 3002 CA) に 3 ml ずつ分注し、付着性細胞 (adherent cells) を除くため、5% CO₂, 37°C, 100% 湿度の条件下で 1 時間静置した。静置終了後、非付着性細胞 (nonadherent cells) 浮遊液を採取し、1 回洗浄後 McCoy 5A 培養液 (Grand Island Biological Co. GIBCO, NY) に再浮遊させ、骨髓単核細胞として CFU-C の測定に用いた。同一の骨髓提供者から採取された骨髓細胞を後日別の実験に繰り返し使用する必要がある場合には、採取した骨髓単核細胞を既報の方法¹¹⁾で冷凍保存し、必要に応じて解凍、洗浄して CFU-C の培養に用いた。冷凍保存-解凍による骨髓細胞のコロニー形成能の低下はほとんど認められなかった。

末梢血リンパ球は、骨髓の提供者を含む多数の健康人からヘパリン加静脈血を採取し、生理的食塩水で 2 倍に稀釈後 Ficoll-Hypaque 法により単核細胞を分離することによって得た。リンパ球は RPMI 1640 培養

液 (GIBCO) で 3 回洗浄後、15% 非働化ヒトプール血清加 RPMI 1640 培養液に 1×10^6 /ml の濃度で浮遊させ、以下の混合リンパ球培養に用いた。

II. 混合リンパ球培養 (MLC)

同種抗原刺激リンパ球を得るために、 5×10^6 のリンパ球を反応細胞とし、2000 rad の X 線を照射した非血縁者のリンパ球 5×10^6 を刺激細胞とする one way bulk MLC を行った。すなわち、培養フラスコ (50 ml Falcon # 3013) に I で得られたリンパ球浮遊液 5 ml, X 線照射した非血縁者のリンパ球浮遊液 5 ml をそれぞれ加え、5% CO₂, 37°C, 100% 湿度の条件下で培養を行った。Control culture として、非血縁者のリンパ球のかわりに X 線照射した自己リンパ球を刺激細胞として加えたものを培養した。培養開始後、2-3 日目、6-7 日目、および 9-10 日目に培養リンパ球を採取し、RPMI 1640 培養液にて 2 回洗浄後、トリパンプルー色素排泄試験により生細胞数を算定した。このようにして得られた同種抗原刺激リンパ球および control culture より得られた非刺激リンパ球は McCoy 5A 培養液に 2×10^6 /ml の濃度で浮遊させ、骨髓単核細胞との coculture study に用いた。

III. CFU-C の測定

CFU-C の測定は Pike & Robinson¹²⁾ の方法に準じて行った。培養液は、Pike らの処方に従ってアミノ酸やビタミンを添加した McCoy 5A 培養液に FCS を 15% 加えたものを plating medium として用いた。この plating medium に寒天 (Bacto agar, DIFCO Lab. Detroit Mich) を 0.5% 加え、さらに正常ヒト末梢血より得た白血球を 1×10^6 /ml となるように添加し、この 1 ml を 35 mm の組織培養皿 (Falcon # 3001) に分注して feeder layer を作製した。ついで骨髓単核細胞を、0.3% 寒天を含む plating medium に 1×10^5 /ml となるように調整し、その 1 ml を overlay として feeder layer に重層した。培養は 5% CO₂, 37°C, 100% 湿度の条件下で 12 日~14 日間行い、培養終了後倒立顕微鏡下で 40 個以上の細胞からなるコロニーを CFU-C として算定した。成績は triplicate で行った培養の平均 CFU-C 数として示した。

IV. 同種抗原刺激リンパ球と骨髓単核細胞との coculture

骨髓単核細胞浮遊液に同種抗原刺激リンパ球または非刺激リンパ球を、骨髓単核細胞 1 に対して 0.5, 1.0 または 2.0 の割合で加えた後 0.3% となるように寒天を加えて overlay とし、III の方法に従って培養を行った。成績は、同種抗原刺激リンパ球を加えずに骨髓単核細胞を単独で培養して得られた CFU-C 数を 100% とし、coculture によって得られた CFU-C 数

を%コントロールで示した。

V. 同種抗原刺激リンパ球の性状の検討

1. 同種抗原刺激リンパ球培養上清の CFU-C に及ぼす影響

培養 6 日目の MLC より細胞浮遊液を採取し、400 G 10 分間遠心後得られた上清を孔径 45 μm のフィルター (Millex®-HA, Millipore Corp. Ma) に通し、培養上清とした。得られた培養上清は CFU-C 測定用の培地に、最終濃度が 10% になるように加え CFU-C に及ぼす影響を検討した。

2. X線照射した同種抗原刺激リンパ球の CFU-C に及ぼす影響

骨髓細胞と coculture する同種抗原刺激リンパ球の X線感受性を検討するために、KXC-18-2 型深部治療用 X線装置 (東芝) を用いて同種抗原刺激リンパ球に 2000 rad の X線を照射した後、骨髓細胞と coculture した。

3. T細胞, non-T細胞の分離

MLC 培養 6 日目に採取した同種抗原刺激リンパ球を $5 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に調整し、80%FCS 加 RPMI 1640 培養液に $1 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度で浮遊したノイラミダーゼ (ヘキスト) 処理羊赤血球 (sheep red blood cells, 以下 SRBC と略) を等量加えて 200 G, 5 分間遠心後 4°C で 60 分間静置した。その後 pellet を静かに再浮遊させ Ficoll-Hypaque gradient に重層し 400 G, 30 分間遠心した。Ficoll-Hypaque との境界に層状に分布する E ロゼット非形成細胞を採取し、3 回洗浄後 McCoy 5A 培養液に浮遊させ同種抗原刺激 non-T 細胞とした。一方、採取した pellet は tris-NH₄Cl buffer で溶血させ、3 回洗浄後 McCoy 5A 培養液に浮遊させ同種抗原刺激 T 細胞として骨髓細胞との coculture に用いた。このようにして得られた T および non-T 細胞分画に再度 SRBC を加えて E ロゼットを形成させると、E ロゼット形成細胞は T 細胞分画では 90%~94%、non-T 細胞分画では 4%~8% と、T 細胞と non-T 細胞は効率よく分離されていた。

4. 同種抗原刺激リンパ球のモノクローナル抗体による T細胞サブセットの解析

ヒト T細胞分化抗原および Ia 様抗原に対するモノクローナル抗体である OKT4, OKT8 および OKIa1 (Ortho Pharmaceutical Corp. Raritan NJ) を用いて、培養 6 日目の MLC から得られた同種抗原刺激リンパ球の T細胞サブセットの分布を検索した。 $1 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度に調整した同種抗原刺激リンパ球浮遊液 0.1 ml にモノクローナル抗体 5 μl を加え、4°C で 30 分間反応させた後 phosphate buffered saline (以下 PBS と略) にて 3 回洗浄した。再浮遊した T細胞に

40 倍稀釈した蛍光標識抗マウス IgG ヤギ血清 (以下 G/M FITC と略, Cappel Laboratories) を等量ずつ加え 4°C で 30 分間反応させた。反応終了後 PBS にて 3 回洗浄し、再浮遊させた pellet の一滴をスライドガラスに載せ蛍光顕微鏡で蛍光陽性細胞の比率を算定した。算定は少なくとも 400 個以上の細胞を観察して行った。

5. モノクローナル抗体と補体を用いた T細胞サブセットの除去と単離

まず同種抗原刺激 T細胞サブセットの CFU-C に及ぼす影響を検討するため、モノクローナル抗体と補体の処理により同種抗原刺激 T細胞から各 T細胞サブセットを除去した。3 で得られた同種抗原刺激 T細胞を $1 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度で RPMI 1640 培養液に浮遊させ、その 0.2 ml に 5 μl の OKT4, OKT8, または OKIa1 を加えて 30 分間 4°C で放置後、3 倍に稀釈したウサギ補体 (Lot 029957A, Behlingwerke AG, Marburg, West Germany) を加え 37°C にて 45 分間反応させた。コントロールとして、同種抗原刺激 T細胞浮遊液に抗体を加えず補体のみを加えて同様の操作を行った。反応終了後大量の RPMI 1640 培養液で 1 回洗浄した後、細胞濃度は調整せずにそのまま 1 ml の McCoy 5A 培養液に浮遊させ骨髓細胞との coculture に用いた。Coculture に必要な細胞浮遊液を取り出した後、残った抗体-補体処理後の細胞浮遊液からメランジュールで 1 容をとり 0.3% トリパンブルー溶液 10 容と混合した後生細胞数を算定した。各モノクローナル抗体処理後の % killing は次式によって計算した。

$$\% \text{killing} = \left(1 - \frac{\text{抗体-補体処理後の生細胞数}}{\text{抗体処理前の総細胞数}} \right) \times 100$$

モノクローナル抗体と補体による処理後に目的とする T細胞サブセットの除去率を間接蛍光抗体法を用いて検索したところ、各モノクローナル抗体と補体処理後の標的細胞の除去率は OKT4 処理で 92~94%、OKT8 処理で 93~96%、OKIa1 処理で 84~90% であった。一方、OKT4 または OKT8 と補体で処理した後に残った細胞の一部は生細胞数を $2 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に再調整し、OKT4 で処理したものを OKT8 陽性細胞 (以下 OKT8⁺細胞と略)、OKT8 で処理したものを OKT4 陽性細胞 (以下 OKT4⁺細胞と略) とした。以上の操作で得られた T細胞サブセットを間接蛍光抗体法で検定したところ、OKT4⁺細胞中の OKT4 陽性細胞は 85~90%、OKT8⁺細胞中の OKT8 陽性細胞は 80~86% であった。

VI. データの統計学的解析

得られたデータの有意差検定は Student's *t* テストを用いて行い、*p* 値が 0.05 以下の場合に有意差ありと判

定した。

成 績

1. 同種抗原刺激リンパ球の第3者骨髄 CFU-C に及ぼす影響 (図1-a)

MLC の培養 2-3 日目, 6-7 日目, または 9-10 日目に採取した同種抗原刺激リンパ球を, MLC に用いたリンパ球提供者とは無関係な第3者の骨髄細胞と coculture した。その結果培養 2-3 日目の同種抗原刺激リンパ球では, 2×10^5 の添加でも CFU-C 数は 117.2 ± 22 と有意な変化はみられなかった ($p > 0.1$) が, 培養 6-7 日目および 9-10 日目の同種抗原刺激リンパ球では 1×10^5 の添加で CFU-C 数はそれぞれ 63.6 ± 9.8 ($p < 0.001$), 75.1 ± 8.0 ($p < 0.005$) となり有意な CFU-C の抑制がみられた。また, この CFU-C 抑制効果の程度は添加する同種抗原刺激リンパ球に dose-dependent であった。一方同種抗原非刺激リンパ球では, 培養期間にかかわらずリンパ球の添加による CFU-C の有意な変化はみられなかった。培養 6-7 日目の同種抗原刺激リンパ球と培養 9-10 日目の同種

抗原刺激リンパ球との比較では, 前者の方がやや強い CFU-C の抑制を示したが抑制効果に有意差はみられなかった ($p > 0.05$)。

2. 同種抗原刺激リンパ球の自己骨髄 CFU-C に及ぼす影響 (図1-b)

つぎに coculture する骨髄細胞が MLC における反応細胞の提供者から得られた場合, すなわち自己骨髄細胞との coculture について検討した。培養 6 日目の同種抗原刺激リンパ球を自己骨髄細胞と coculture したところ, 2×10^5 の添加で CFU-C 数は 63.2 ± 13.0 となり有意な抑制が認められた ($p < 0.01$)。なお, 同種抗原刺激リンパ球の第3者骨髄 CFU-C に対する抑制と自己骨髄 CFU-C に対する抑制とでは抑制効果の程度に有意差は認められなかった ($p > 0.2$)。

3. 同種抗原刺激リンパ球が MLC の刺激細胞提供者由来の骨髄 CFU-C に及ぼす影響 (図1-c)

同種抗原刺激リンパ球を MLC における刺激細胞の提供者由来の骨髄細胞と coculture した場合には 2×10^5 の添加で CFU-C 数は 18.1 ± 6.9 となり, 第3者骨髄や自己骨髄に対する抑制に比較して極めて強い

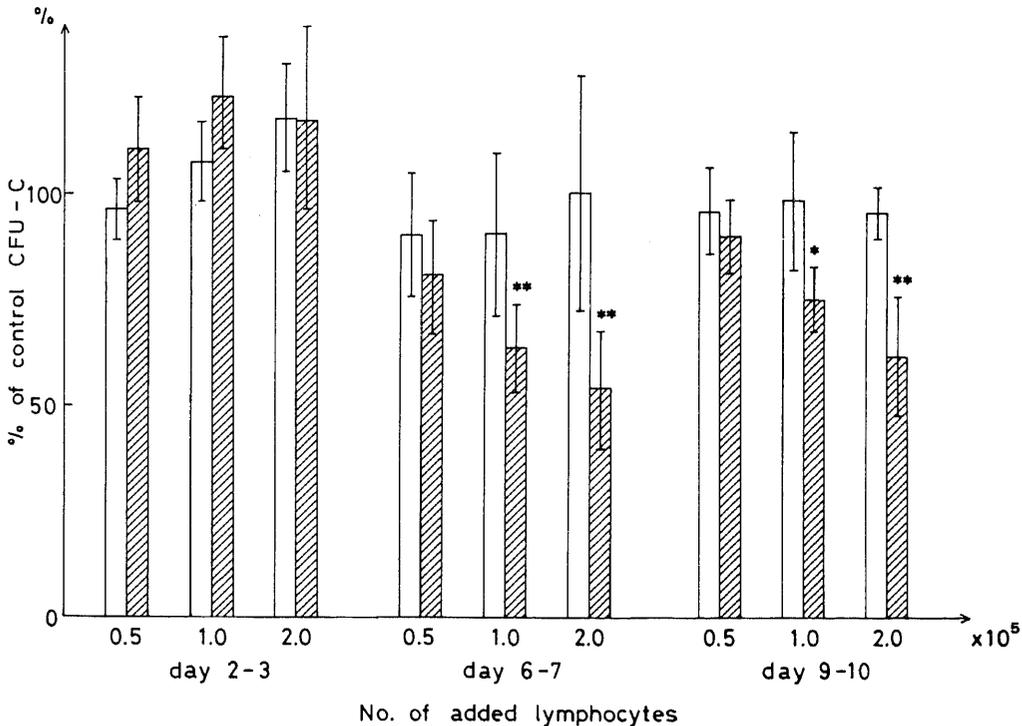


Fig. 1-a. Effect of alloantigen-stimulated lymphocytes on colony forming unit in culture (CFU-C). Allogeneic bone marrow cells were cultured with unstimulated (\square) or alloantigen-stimulated lymphocytes (▨) from day 2-3, day 6-7, or day 9-10 mixed lymphocyte culture (MLC), respectively. Data are expressed as mean \pm SD of 6 separate experiments. * $p < 0.005$, ** $p < 0.001$

CFU-Cの抑制が認められた ($p < 0.001$).

4. 同種抗原刺激リンパ球培養上清のCFU-Cに及ぼす影響 (図2)

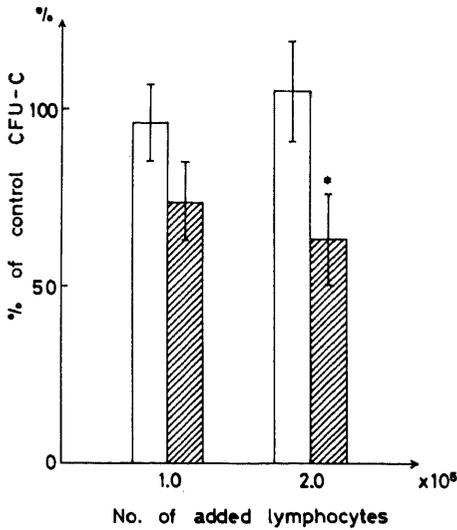


Fig. 1 - b. Effect of alloantigen-stimulated lymphocytes on CFU-C. Autologous bone marrow cells were cultured with unstimulated (\square) or alloantigen-stimulated (hatched) lymphocytes from day 6 MLC. Data are expressed as mean \pm SD of 4 separate experiments. * $p < 0.01$

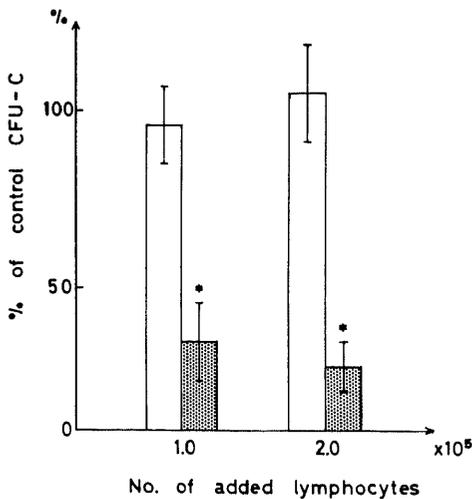


Fig. 1 - c. Effect of alloantigen-stimulated lymphocytes on CFU-C. Bone marrow cells from donors of stimulator cells in MLC were cultured with unstimulated (\square) or alloantigen-stimulated responder (hatched) lymphocytes from day 6 MLC. Data are expressed as mean \pm SD of 4 separate experiments. * $p < 0.001$

培養 6 日目の MLC から得られた非刺激リンパ球培養上清または同種抗原刺激リンパ球培養上清をそれぞれ最終濃度が 10% になるように overlayer に添加したところ、CFU-C 数はそれぞれ 92.4 ± 14.3 ($p > 0.2$) 64.0 ± 7.5 ($p < 0.005$) となり同種抗原刺激リンパ球培養上清を添加したときのみ CFU-C の有意な抑制がみられた。

5. 同種抗原刺激リンパ球の CFU-C 抑制効果に対する X 線照射の影響 (図 3)

培養 6 日目の非刺激リンパ球および同種抗原刺激リンパ球に 2000 rad の X 線を照射した後骨髓細胞と co-culture し、X 線を照射しない非刺激または同種抗原刺激リンパ球の CFU-C に対する抑制効果と比較した。その結果 X 線照射後の非刺激リンパ球または同種抗原刺激リンパ球の添加では CFU-C 数は 96.8 ± 3.7 , 58.8 ± 8.2 となり、X 線照射をしないリンパ球の添加時とほぼ同じ傾向を示した。

6. 同種抗原刺激 T 細胞および non-T 細胞の CFU-C に及ぼす影響 (図 4)

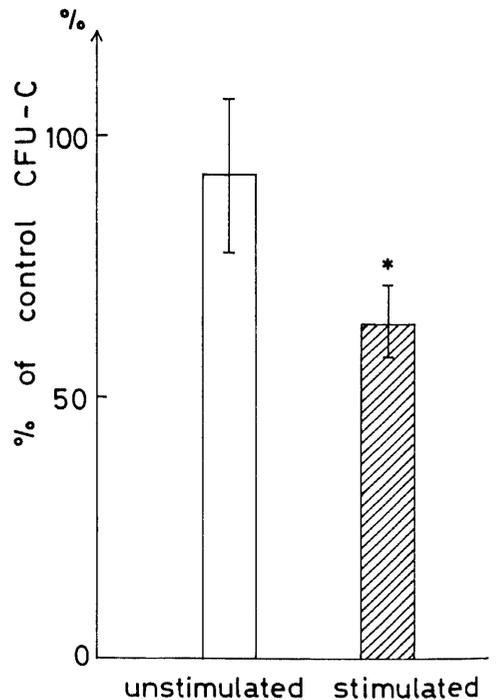


Fig. 2. Effect of MLC supernatant on CFU-C. Culture supernatant from unstimulated lymphocytes (\square) or day 6 MLC (hatched) were added to CFU-C assays at a concentration of 10% in the culture media. Data are expressed as mean \pm SD of 5 separate experiments. * $p < 0.005$

同種抗原刺激によって誘導される CFU-C 抑制性細胞の性状をさらに明らかにするため、培養 6 日目の非刺激および同種抗原刺激リンパ球を T 細胞と non-T 細胞に分離後骨髓細胞と coculture し、その CFU-C 抑制効果を非分離リンパ球と比較した。その結果 T 細胞の添加時には CFU-C 数は 62.6 ± 9.8 ($p < 0.005$) となり非分離リンパ球よりやや強い ($p > 0.1$) CFU-C の抑制がみられたが、同種抗原刺激 non-T 細胞や非刺激

T 細胞、non-T 細胞の添加では CFU-C の有意な抑制はみられなかった ($p > 0.1$)。

7. 同種抗原誘導 CFU-C 抑制性 T 細胞のモノクローナル抗体を用いた解析

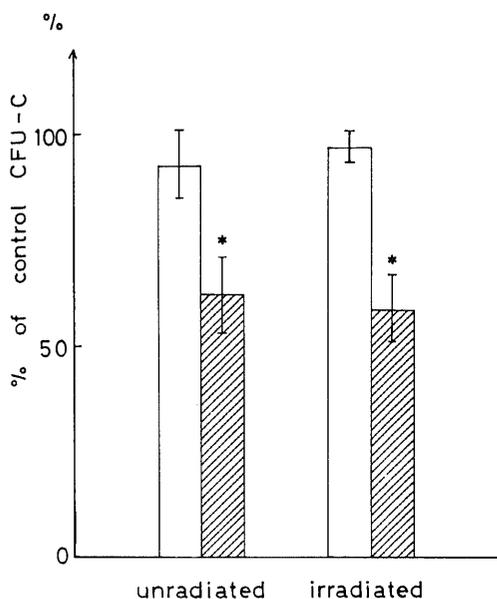


Fig. 3. Radiation sensitivity of CFU-C suppressor cells. Unstimulated (□) or alloantigen-stimulated (▨) lymphocytes from day 6 MLC were irradiated with 2000 rad and cultured with allogeneic bone marrow cells at a bone marrow 1: lymphocyte 2 ratio. Data are expressed as mean \pm SD of 4 separate experiments. * $p < 0.005$

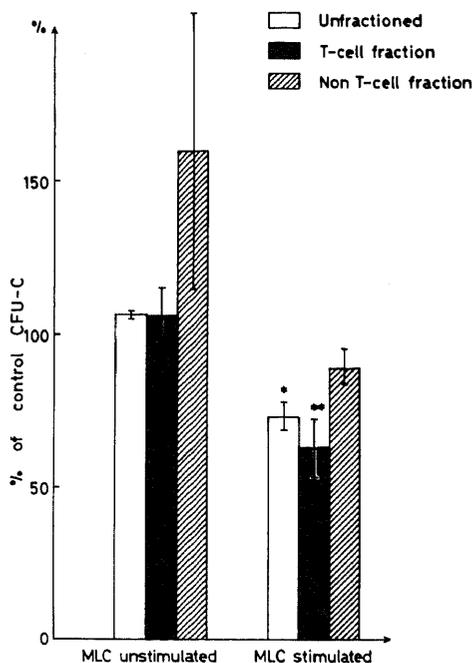


Fig. 4. Effect of alloantigen-stimulated lymphocyte subpopulations on CFU-C. Lymphocytes unstimulated or stimulated in MLC for 6 days were fractionated by using a rosette sedimentation technique into T-enriched and T-depleted fractions and cultured with bone marrow cells at a bone marrow 1: lymphocyte 1 ratio. Data are expressed as mean \pm SD of 4 separate experiments. * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$

Table 1. OK phenotype of alloantigen-stimulated T cells

	OKT4	OKT8	OKIa1
Exp. 1	52.9	31.0	50.0
2	36.6	41.0	46.7
3	55.1	40.5	42.3
4	55.4	34.4	33.3
M \pm SD	50.0 ± 7.8 (53.3 ± 8.3)	36.7 ± 4.2 (28.8 ± 6.9)	43.0 ± 6.3 (4.3 ± 1.4)

Percent positive cells were determined for cells treated with each monoclonal antibody and G/M FITC. Each parenthesis represents the mean value \pm 1SD among peripheral blood T cells from 4 normal subjects.

表1はMLC培養6日目の同種抗原刺激T細胞について、モノクローナル抗体で識別される各T細胞分化抗原陽性細胞の分布を調べたものである。健康人新鮮リンパ球に比べてOKT8⁺細胞の軽度増加とIa⁺細胞の著明な増加が認められた。これらの phenotype を示す同種抗原刺激T細胞のうち、どの phenotype を持ったT細胞サブセットがCFU-Cの抑制に関与しているかを明らかにするため、MLC培養6日目の同種抗原刺激T細胞をモノクローナル抗体と補体で処理した後骨髄細胞と coculture した。その結果は図5に示されるように、同種抗原刺激T細胞のCFU-C抑制効果はOKT8またはOKIa1と補体で処理した時にほぼ完全に消失した。一方、OKT4と補体の処理はCFU-Cの抑制効果にほとんど影響を与えなかった。各モノクローナル抗体と補体処理後の%killingは表1の phenotype の分布と常によく一致していた。

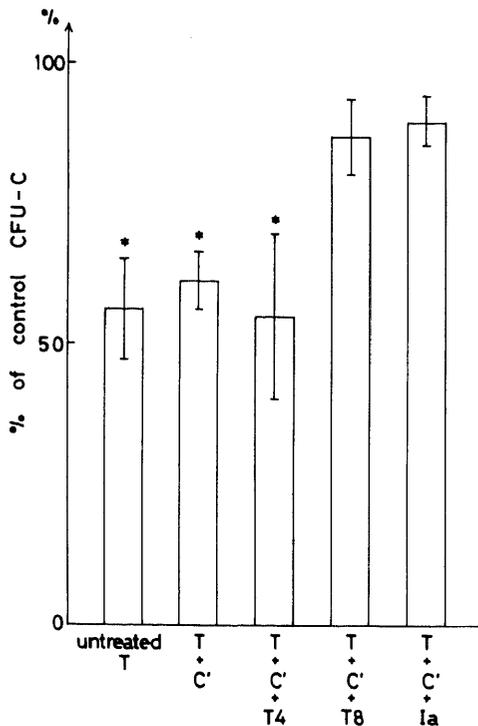


Fig. 5. Effect of antibody and complement treatment on the ability of alloantigen-stimulated T cells to suppress CFU-C. 2×10^5 alloantigen-stimulated T cells from day 6 MLC were treated with OKT4 (T4), OKT8 (T8), or OKIa1 (Ia) and complement (C) or complement alone and cultured with 1×10^5 bone marrow cells. Data are expressed as mean \pm SD of 4 separate experiments. * $p < 0.005$

8. 同種抗原刺激T細胞サブセットのCFU-Cに及ぼす影響(図6)

OKT4またはOKT8と補体処理後の同種抗原刺激T細胞の細胞数を再調整することによって得られたOKT4⁺細胞とOKT8⁺細胞をそれぞれ骨髄細胞と coculture し CFU-C に及ぼす影響を検討した。同時に培養6日目の非刺激T細胞から同様の方法で得られたOKT4⁺細胞およびOKT8⁺細胞も coculture した。その結果同種抗原刺激OKT8⁺細胞の添加ではCFU-C数は 56.8 ± 12.2 となり、同種抗原刺激非分離T細胞添加時と同様に有意なCFU-Cの抑制がみられた ($p < 0.005$)。一方、同種抗原刺激OKT4⁺細胞や、非刺激OKT4⁺細胞およびOKT8⁺細胞の添加ではCFU-Cに有意な変化は認められなかった ($p > 0.2$)。

考 察

本研究によりMLCにおいて同種抗原による刺激を6日から10日間受けたリンパ球はCFU-Cの分化、増殖を非特異的に抑制し、そのCFU-C抑制性細胞は放射線抵抗性を有するOKT8⁺Ia⁺のT細胞であることが明らかになった。さらにこのCFU-Cの抑制活性は同種抗原刺激リンパ球の培養上清中にも認められたこ

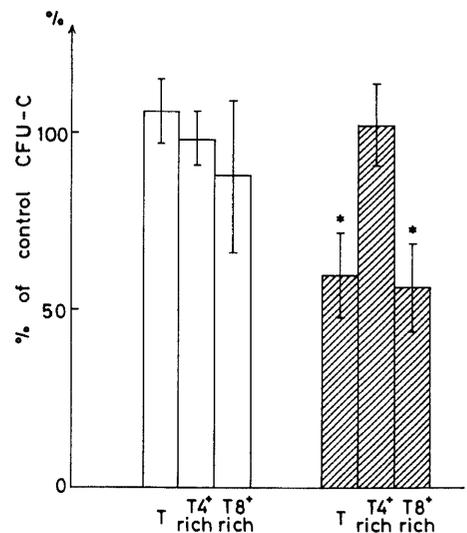


Fig. 6. Effect of alloantigen-stimulated T cell subsets defined with OKT4 or OKT8 on CFU-C. OKT4⁺ (T4⁺) rich and OKT8⁺ (T8⁺) rich fractions of unstimulated (□) or alloantigen-stimulated (▨) T cells from day 6 MLC were obtained by a negative selection technique and cultured with bone marrow cells at a bone marrow 1: lymphocyte 2 ratio. Data are expressed as mean \pm SD of 4 separate experiments. * $p < 0.005$

とから、同種抗原刺激を受けたりンパ球は cytotoxic/suppressor phenotype 陽性の T 細胞から産生される抑制因子を介して CFU-C に抑制的に作用すると考えられる。

最近 Talley ら¹³⁾は今回の実験とほぼ同様の実験系を用いて、同種抗原によって刺激を受けた T 細胞とその培養上清が CFU-C に抑制的に作用することを示した。一方、MLC において同種抗原による刺激を受けた T 細胞はその MLC の培養早期に CSA を産生することが知られている¹⁴⁾。今回の実験でしめした同種抗原刺激リンパ球による CFU-C の抑制効果は、Talley らの報告した CFU-E に対する抑制効果に比べるとかなり弱い。これは MLC の培養後期に産生された CFU-C の抑制因子が培養早期の CSA によってある程度相殺されたためと考えられる。

同種抗原刺激によって誘導された CFU-C 抑制性リンパ球は第 3 者の骨髓 CFU-C に対しても (図 1-a)、また自己骨髓 CFU-C に対しても (図 1-b) 同じ程度の抑制効果を示した。従ってこの同種抗原刺激 T 細胞による CFU-C の抑制は human leukocyte antigen (以下 HLA と略) による制約を受けないものと考えられる。一方、同種抗原刺激リンパ球を MLC における刺激細胞提供者由来の骨髓細胞と coculture した場合には、骨髓細胞提供者が MLC の刺激細胞提供者と無関係な場合は異なり極めて強い CFU-C の抑制がみられた (図 1-c)。これは同種抗原によって感作された T 細胞から、MLC の刺激細胞と同じ HLA を持つ CFU-C に対して細胞傷害性 T 細胞が産生されたためと考えられる¹⁵⁾。

このような MLC において誘導される細胞傷害性 T 細胞は Reinherz ら¹⁶⁾により OKT8 陽性、Ia 陰性細胞であることが明らかにされている。今回示した CFU-C 抑制性 T 細胞は OKT8 陽性、Ia 陽性細胞であることから、図 1-a、1-b に示される同種抗原刺激リンパ球による CFU-C の抑制には細胞傷害性 T 細胞は関与していないと考えられる。

MLC における同種抗原刺激は細胞傷害性 T 細胞のみならず natural killer 細胞 (以下 NK 細胞と略) をも誘導することが知られている¹⁷⁾¹⁸⁾。最近、この NK 細胞が CFU-C の分化、増殖に抑制的に働くことが報告された¹⁹⁾。今回骨髓細胞との coculture に用いた同種抗原刺激リンパ球の中には NK 細胞も含まれていると考えられるが、既に報告されているように NK 細胞の surface phenotype は OKT3 陰性、OKT8 陰性であることから²⁰⁾²¹⁾、今回示された CFU-C の抑制が NK 細胞によるものではないことは明らかである。

近年免疫担当細胞、特に T 細胞の造血調節への関与

が注目され、T 細胞サブセットや活性化 T 細胞などの造血幹細胞に及ぼす影響があいついで報告されている^{22)~28)}。T 細胞サブセットについては、まず IgG の Fc 部分に対するレセプターを持つ T γ 細胞の CFU-C に及ぼす影響が注目され、一部の再生不良性貧血患者の末梢血 T γ 細胞²²⁾や健康人の骨髓中の T γ 細胞²³⁾、さらには poke weed mitogen で活性化された末梢血 T γ 細胞²⁴⁾²⁵⁾などが CFU-C に抑制的に働くことが示された。これらとは別にモノクローナル抗体で識別される T 細胞サブセットの末梢血 erythroid burst-forming unit (BFU-E) に及ぼす影響も検討され、末梢血中の T 細胞には赤血球造血を促進するサブセットと抑制するサブセットの 2 つのサブセットが存在することも示唆されている²⁶⁾²⁷⁾。一方、in vitro で誘導された CFU-C 抑制性 T 細胞については、モノクローナル抗体を用いて検討した成績はこれまで報告されていない。今回の OKT シリーズを用いた検索により、同種抗原刺激を受けた T 細胞のうち OKT8⁺ Ia⁺ 細胞は CFU-C に対して抑制的に働くこと、さらに同種抗原刺激を受けた OKT4⁺ 細胞や同種抗原刺激を受けない OKT4⁺ および OKT8⁺ 細胞は CFU-C に有意な影響を及ぼさないことが明らかになった。このことは OKT8⁺ 細胞が同種抗原刺激を受けて活性化されることにより CFU-C 抑制性を獲得しうることを示唆している。

このような同種抗原刺激によって活性化された OKT8⁺ 細胞の in vivo での機能は不明であるが、最近 Bagby²⁸⁾ は 2 例の好中球減少症を呈した患者の骨髓中の OKT3⁺、OKT8⁺ 細胞が患者自身の骨髓 CFU-C を抑制したと報告している。また Aisenberg ら³⁰⁾ も OKT8⁺ 細胞が非腫瘍性増殖を示している患者に著しい好中球減少症が認められたと報告しており、cytotoxic/suppressor T 細胞として知られる OKT8⁺ 細胞が in vitro のみならず in vivo の顆粒球系造血にも関与している可能性が強く示唆される。

一方、MLC における同種抗原刺激により MLC を抑制する抑制性細胞が誘導されることはよく知られている⁸⁾が、最近この MLC 抑制性細胞の surface phenotype が OKT8⁺ Ia⁺ であることが明らかにされた³¹⁾。この MLC 抑制性細胞が今回示した CFU-C 抑制性細胞と同一の細胞であるかどうかについては今後の検討を必要とするが、リンパ球の増殖を調節する T 細胞と造血幹細胞である CFU-C の分化、増殖を調節する T 細胞が少なくとも同じ T 細胞サブセットに属するという事実は極めて興味深い。

生体においてリンパ球が同種抗原に暴露される典型的な例の 1 つに同種骨髓移植を受けた患者があげられる。同種骨髓移植患者では移植後長期間にわたって

OKT8⁺細胞の相対的および絶対的増加が認められることがいくつかの施設³²⁾³³⁾から報告されている。また、骨髄移植後の早期や慢性の graft-versus-host disease (以下 GVHD と略) の時期にみられる免疫不全の原因として抑制性細胞の関与が示唆されている³⁵⁾³⁶⁾。最近われわれは、同種骨髄移植後慢性 GVHD を発症し病勢に一致して汎血球減少症を呈した 1 症例を経験した³⁷⁾。この患者では汎血球減少を呈した時期の末梢血リンパ球が健康人骨髄の CFU-C や CFU-E の増殖を抑制したが、興味深いことに prednisolone 投与により汎血球減少症は改善し、同時に末梢血リンパ球の造血幹細胞抑制作用も認められなくなった。しかし、prednisolone を休薬すると再び汎血球減少症が出現した。また、急性拒絶反応の時期に顆粒球減少症を呈した腎移植患者でも、われわれの症例と同様に末梢血リンパ球が健康人の骨髄 CFU-C を抑制したと報告されている³⁸⁾。これらの症例から、同種抗原刺激を受けたリンパ球は in vitro のみならず in vivo の造血に対しても抑制的に働いている可能性が示唆される。

結 論

活性化リンパ球の造血調節への関与を明らかにするため、同種抗原によって刺激を受けたリンパ球の CFU-C に及ぼす影響を検討した結果以下のような結論を得た。

1. MLC 培養 6 日から 10 日目の同種抗原刺激リンパ球は CFU-C の分化、増殖を非特異的に抑制し、その抑制の程度は添加する同種抗原刺激リンパ球に dose-dependent であった。

2. この CFU-C の抑制は同種抗原刺激リンパ球の添加によってのみならず、その培養上清の添加によっても認められた。

3. 同種抗原刺激リンパ球のうち CFU-C に抑制的に働く細胞は X 線抵抗性の OKT8⁺ Ia⁺T 細胞であった。

以上の成績から、同種抗原刺激によって誘導される CFU-C 抑制性細胞が免疫調節をつかさどる抑制性細胞と類似の性質を持ち、臨床的にみられる汎血球減少症の成因となりうる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師服部純一教授に深甚の謝意を表します。また直接御指導、御援助を戴いた原田実根博士、ならびに多大な御協力を戴いた金沢大学第 3 内科学教室 2 研グループの諸先生および教室員諸氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Till, J. E., & McCulloch, E. A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow. *Rad. Res.*, **14**, 213-222 (1961).
- 2) Chervenick, P. A. & LoBuglio, A. F.: Human blood monocytes: Stimulators of granulocyte and mononuclear colony formation in vitro. *Science*, **178**, 164-166 (1972).
- 3) Cline, M. J. & Golde, D. W.: Production of colony-stimulating activity by human lymphocytes. *Nature*, **248**, 703-704 (1974).
- 4) Ascensão, J., Pahwa, R., Kagan, W., Hansen, J. Moore, M. & Good, R.: Aplastic anemia: Evidence for an immunological mechanism. *Lancet*, **27**, 669-671 (1976).
- 5) Hoffman, R., Zanjani, E. D., Lutton, J. D., Zalusky, R. & Wasserman, L. R.: Suppression of erythroid-colony formation by lymphocytes from patients with aplastic anemia. *N. Engl. J. Med.*, **296**, 10-13 (1977).
- 6) Haynes, B. F. & Fauci, A. S.: Activation of human B lymphocytes. III. Concanavalin A-induced generation of suppressor cells of the plaque-forming cell response of normal human B lymphocytes. *J. Immunol.*, **118**, 2281-2287 (1977).
- 7) Reinherz, E. L. & Schlossman, S. F.: Con A inducible suppression of MLC: Evidence for mediation by the TH₂⁺T cell subset in man. *J. Immunol.*, **122**, 1335-1341 (1979).
- 8) Rinehart, J. J.: Induction of nonspecific, proliferative dependent, suppressor T lymphocytes in human mixed lymphocyte cultures. *Cell. Immunol.*, **56**, 142-151 (1980).
- 9) 尾高和亮・近藤邦夫・中尾真二・末永孝生・塩原信太郎・上田幹夫・原田実根・服部純一: 活性化リンパ球の造血幹細胞に及ぼす影響—Concanavalin A 誘導 suppressor T cell による CFU-C の抑制。医学のあゆみ, **123**, 259-261 (1982).
- 10) 近藤邦夫・尾高和亮・中尾真二・上田幹夫・塩原信太郎・末永孝生・石野千津子・服部純一・原田実根: リンパ球の造血調節への関与。第 2 報。Con A 刺激リンパ球の CFU-E に及ぼす影響。209 頁, 第 24 回日本臨床血液学会総会抄録集, 東京, 1982.
- 11) Harada, M., Ishino, C., Odaka, K. Matsue, K., Shiobara, S., Kodo, H., Mori, T. & Hattori, K.: Conditions for cryopreservation of human

- bone marrow for use in autologous transplantation. *Acta Haematol. Jpn.*, **45**, 754-762 (1982).
- 12) **Pike, B. L. & Robinson, W. A.** : Human bone marrow colony growth in agar-gel. *J. cell. physiol.*, **76**, 77-84 (1970).
- 13) **Talley, R., Rinehart, J. J. & Balcerzak, S. P.** : Autologous and allogeneic suppressor lymphocyte inhibition of human erythroid colony forming unit proliferation. *Exp. Hematol.*, **6**, 505-513 (1982).
- 14) **Cline, M. J. & Golde, D. W.** : Cellular interactions in haematopoiesis. *Nature*, **277**, 177-181 (1979).
- 15) **Fitchen, J. H., Foon, K. A. & Cline, M. J.** : The antigenic characteristics of hematopoietic stem cells. *N. Engl. J. Med.*, **305**, 17-24 (1981).
- 16) **Reinherz, E. L., Hussey, R. E. & Schlossman, S. F.** : Absence of expression of Ia antigen on human cytotoxic T cells. *Immunogenetics*, **11**, 421-426 (1980).
- 17) **Seeley, J. K., Masucci, G., Poros, A., Klein, E. & Golub, S. H.** : Studies on cytotoxicity generated in human mixed lymphocyte cultures. II. Anti-K562 effectors are distinct from allospecific CTL and can be generated from NK-depleted T cells. *J. Immunol.*, **123**, 1303-1311 (1979).
- 18) **Callewaert, D. M., Lightbody, J. J., Kaplan, J., Jaroszewski, J., Peterson Jr., W. D. & Rosenberg, J. C.** : Cytotoxicity of human peripheral lymphocytes in cell-mediated lympholysis; antibody-dependent cell-mediated lympholysis and natural cytotoxicity assays after mixed lymphocyte culture. *J. Immunol.*, **121**, 81-85 (1978).
- 19) **Hansson, M., Beran, M., Andersson, B. & Kiessling, R.** : Inhibition of in vitro granulopoiesis by autologous allogeneic human NK cells. *J. Immunol.* **129**, 126-131 (1982).
- 20) **Zarling, J. M., Bach, F. H. & Kung, P. C.** : Sensitization of lymphocytes against pooled allogeneic cells. II. Characterization of effector cells cytotoxic for autologous lymphoblastoid cell lines. *J. Immunol.*, **126**, 375-378 (1981).
- 21) **López-Botet, M., Silva, A., Rodriguez, J. & de Landazuri, M. O.** : Generation of T cell blasts with NK-like activity in human MLC: Cellular precursors, IL 2 responsiveness, and phenotype expression. *J. Immunol.*, **129**, 1109-1115 (1982).
- 22) **Bacigalupo, A., Podestá, M., Mingari, M. C., Moretta, L., Van Lint, M. T. & Marmont, A. M.** : Immune suppression of hematopoiesis in aplastic anemia: Activity of T-gamma lymphocytes. *J. Immunol.* **125**, 1449-1453 (1980).
- 23) **Spitzer, G. & Verma, D. S.** : Cells with Fc γ receptors from normal donors suppress granulocytic macrophage colony formation. *Blood*, **60**, 758-766 (1982).
- 24) **Bacigalupo, A., Podestá, M., Mingari, M. C., Moretta, L., Piaggio, G., Van Lint, M. J., Durando, A. & Marmont, A. M.** : Generation of CFU-C/suppressor T cells in vitro: An experimental model for immune-mediated marrow failure. *Blood*, **57**, 491-496 (1981).
- 25) **Ascensao, J. L., Kay, N. E., Banisadre, M. & Zanjani, E. D.** : Cell-cell interaction in human granulopoiesis: Role of T lymphocytes. *Exp. Hematol.*, **9**, 473-478 (1981).
- 26) **Torok-Storb, B., Martin, P. J. & Hansen, A.** : Regulation of in vitro erythropoiesis by normal T cells: Evidence for two T-cell subsets with opposing function. *Blood*, **58**, 171-174 (1981).
- 27) **Mangan, K. F., Chikkappa, G., Bieler, L. Z., Scharfman, W. B. & Parkinson, D. R.** : Regulation of human blood erythroid burst-forming unit (BFU-E) proliferation by T-lymphocyte subpopulations defined by Fc receptors and monoclonal antibodies. *Blood*, **59**, 990-996 (1982).
- 28) **Podestá, M., Frassoni, F., Van Lint M. T., Piaggio, G., Marmont, A. & Bacigalupo, A.** : Generation of CFU-C suppressor T cells in vitro. II. Effect of PHA, PWM and Con-A on bone marrow and peripheral blood lymphocytes from healthy donors. *Exp. Hematol.* **10**, 256-262 (1982).
- 29) **Bagby, Jr. G. C.** : T lymphocytes involved in inhibition of granulopoiesis in two neutropenic patients are of the cytotoxic/suppressor (T3⁺ T8⁺) subset. *J. Clin. Invest.*, **68**, 1597-1600 (1981).
- 30) **Aisenberg, A. C., Wilkes, B. M., Harris, W. L., Ault, K. A. & Carey, R. W.** : Chronic T-cell lymphocytosis with neutropenia: Report of a case studied with monoclonal antibody. *Blood*, **58**, 818-822 (1981).
- 31) **Hess, A. D., Donnenberg, A. D., Tutschka, P. J. & Santos, G. W.** : Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro. V. Analysis of responding T lymphocyte subpopulations in primary MLR with monoclonal antibodies. *J.*

Immunol., 130, 717-721 (1983).

32) de Bruin, H. G., Astaldi, A., Leupers, T., Van de Griend, R. J., Dooren, L. J., Schellekens, P. T. A., Tanke, H. J., Roos, M. & Vossen, J. M.: T lymphocyte characteristics in bone marrow-transplanted patients. II. Analysis with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 127, 244-251 (1981).

33) Atkinson, K., Hansen, J. A., Storb, R., Goehle, S., Goldstein, G. & Thomas, E. D.: T-cell subpopulations identified by monoclonal antibodies after human marrow transplantation. I. Helper-inducer and cytotoxic-suppressor subsets. *Blood*, 59, 1292-1298 (1982).

34) Schroff, R. W., Gale, R. P. & Fahey, J. J.: Regeneration of T cell subpopulations after bone marrow transplantation: Cytomegalovirus infec-

tion and lymphoid subset imbalance. *J. Immunol.*, 129, 1926-1930 (1982).

35) Storb, R., Tsoi, M. S., Witherspoon, R. P., Sullivan, K., Lum, L., Deeg, H. J. & Atkinson, K.: Unique immunologic problems in human bone marrow transplant recipients. *Transplant. Proc.*, 13, 1624-1627 (1981).

36) Tsoi, M. S.: Immunological mechanisms of graft-versus-host disease in man. *Transplantation*, 33, 459-464 (1982).

37) 近藤邦夫, 金沢大学骨髄移植チーム: VOD, GVHD, pancytopenia 等, 興味ある経過をたどった同種骨髄移植の1例. *移植* 18, 283頁(1983).

38) Gorski, A.: Cells suppressing hematopoiesis in human renal allograft rejection. *Biomedicine*, 29, 299-301 (1978).

Role of Activated Lymphocytes in the Regulation of Hematopoiesis: Effect of Alloantigen-Stimulated Lymphocytes on Granulocyte-Macrophage Progenitor Cells Shinji Nakao Department of Internal Medicine (III), (Director: Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - Juzen Med. Soc., 92, 800-810 (1983)

Key words: Colony forming unit in culture (CFU-C), Mixed lymphocyte culture (MLC), T-cell subset, Monoclonal antibody

Abstract

Effects of alloantigen-stimulated lymphocytes on granulocyte macrophage progenitor cells, colony forming unit in culture (CFU-C) were studied in an attempt to clarify the role of activated lymphocytes in the regulation of hematopoiesis. When alloantigen-stimulated lymphocytes from day 2-3 mixed lymphocyte culture (MLC) were cultured with allogeneic bone marrow cells, the number of CFU-C showed no significant change. In contrast, dose dependent suppression of CFU-C was observed when stimulated lymphocytes from day 6-7 and day 9-10 MLC were added to the cultures of autologous or allogeneic bone marrow cells for CFU-C assays. Culture supernatant from the alloantigen-stimulated lymphocytes in day 6 MLC also suppressed colony formation of CFU-C. The CFU-C suppressive activity of the alloantigen-stimulated lymphocytes was detected in the T cell fraction but not in the non-T cell fraction. For further characterization of these CFU-C suppressor cells, alloantigen-stimulated lymphocytes were treated with radiation (2,000 rad) or monoclonal antibodies against T cell subsets and complement prior to the culture. The suppressive activity was completely abolished by the treatment with OKT8 or OKIa1 antibodies and complement, while the suppression was still retained after radiation. Furthermore, only the OKT8⁺-rich fraction of alloantigen-stimulated lymphocytes exerted significant suppression of CFU-C, whereas the OKT4⁺-rich fraction of alloantigen-stimulated lymphocytes and OKT4⁺- or OKT8⁺-rich fractions of unstimulated lymphocytes did not show significant effects on CFU-C. These observations suggest that the CFU-C suppressor cells are radioresistant and OKT8- or Ia-positive T cells, which may be induced by alloantigen-stimulation in MLC.