Induction of IgG and IgA Production in Neonatal B Cells by Memory CD4+T Cell Subset Expressing L-selectin

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/2297/8522

L-セレクチン発現メモリー CD4 陽性T細胞による新生児未熟B細胞の IgG および IgA 産生の誘導

金沢大学医学部小児科学講座（主任：谷口　昂教授）
辻　　隆　男

新生児期の免疫グロブリン (immunoglobulin, Ig) 産生は極めて不良であり，またそのほとんどが IgM に限られている．このような新生児期免疫能の特徴には，B細胞ならびにT細胞双方の機能的未熟性が強く関与していると考えられている．成人末梢血 $CD4^+T$ 細胞の内，CD45RO 抗原を発現する，いわゆるメモリー $CD4^+T$ 細胞がB細胞の成熟，分化を促進し，免疫グロブリン産生を誘導する活性を強く有することが知られている．一方，新生児期 $CD4^+T$ 細胞には CD45RO 抗原発現がほとんど認められず，この時期のT細胞の機能的未熟性の少なくとも一部は，メモリー $CD4^+T$ 細胞が欠如していることにより説明される．本研究では，メモリー $CD4^+T$ 細胞の異なる亜群を新生児B細胞に添加，ポークウィードマイトジェン (pokeweed mitogen, PWM) 刺激下で培養し，IgG ならびに IgA 産生細胞への分化誘導を試みた．新生児B細胞にナイーブ $CD4^+T$ 細胞を添加してもほとんど Ig 産生は認められなかったが，メモリー $CD4^+T$ 細胞との混合培養により IgM 産生が強く誘導された．さらに重要なことに，少量ではあるが IgG および IgA の産生も明らかに誘導された．メモリー $CD4^+T$ 細胞はホーミングレセプター (homing receptor) である L-セレクチン (L-selectin) の発現により，さらに2つの異なる亜群に分画できることが知られている．本研究では，これら異なるメモリー $CD4^+T$ 細胞亜群のB細胞分化誘導能を比較検討した．L-セレクチン陰性メモリー $CD4^+T$ 細胞は表面 IgD^- メモリーB細胞の Ig 産生を強く促進した．これに対して，表面 IgD^+ ナイーブB細胞，あるいは新生児B細胞を用いた場合には，L-セレクチン陽性T細胞の方が明らかに強い Ig 産生誘導能を示し，特に IgG および IgA の有意な産生も観察された．以上の結果より，適切なT細胞亜群の存在下では新生児ナイーブB細胞による IgG および IgA 産生誘導が可能であること，さらにこのようなクラススイッチの誘導にはメモリー $CD4^+T$ 細胞の内，L-セレクチン陽性亜群が最も有効であることが示された．

Key words immunoglobulin production, neonatal B cells, memory $CD4^+T$ cells, L-selectin, class switch

B細胞は免疫システムの重要な構成要素の一つであり，その分化誘導により産生される抗体は，種々の病原に対する防御機構のなかで重要な役割を果たすことが知られている．抗原未感作のB細胞は免疫グロブリン M (immunoglobulin M, IgM) のみを産生するが，生後種々の特異抗原刺激によりクラススイッチが誘導され，IgG, IgA など他のクラスの Ig 産生も可能となる．このようなクラススイッチがおこるためには，最初に Ig 重鎖遺伝子の再構成が誘導される必要がある[1]．クラススイッチの誘導は主としてT細胞由来のサイトカイン，すなわちインターロイキン-4 (interleukin 4, IL-4)，インターフェロン-γ (interferon-γ, IFN-γ)，トランスフォーミング増殖因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β) などの液性因子により調節される[2)~5)]．さらにサイトカインによる調節のみでなく，B細胞とT細胞との物理的接触による細胞間相互作用による付加的シグナルが必要であることも報告されている[6)7)]．特に，B細胞表面上の CD40 抗原と，活性化T細胞に発現するリガンド gp39 蛋白の結合は，クラススイッチ誘導に極めて重要な役割を果たすことが明らかとなりつつある[8)~10)]．

B細胞の Ig 分泌細胞への分化においては，T細胞の中でも $CD4^+T$ 細胞の役割が重要であることが知られている．$CD4^+T$ 細胞はさらに CD45RO 発現によりナイーブ ($CD45RO^-$) あるいはメモリー ($CD45RO^+$) $CD4^+T$ 細胞とに分画可能であり，このうちナイーブ $CD4^+T$ 細胞はB細胞分化誘導能を殆ど認めない[11)~14)]．しかしメモリー $CD4^+T$ 細胞は IL-4, IL-5 あるいは IFN-γ のようないくつかのサイトカインを産生し[15)16)]，さらに細胞接着に関与する多くの補助分子の表面発現がナイーブ細胞に比し増強している[17)]．生後抗原刺激を繰り返すことによりナイーブ $CD4^+T$ 細胞は活性化され，CD45RO を発現，末梢血においては抗原特異的に反応するメモリー $CD4^+T$ 細胞が次第に増加すると考えられている[18)]．しかし，特異抗原感作に伴う CD45RO 発現により，全ての $CD4^+T$ 細胞がクラススイッチ誘導能を獲得するのか，あるいは特定のメモリー $CD4^+T$ 細胞亜

平成5年12月15日受付，平成6年1月13日受理

Abbreviations: AET, 2-aminoethylisothiouronium bromide; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; IFN-γ, interferon-γ; Ig, immunoglobulin; IL, interleukin; mAb, monoclonal antibody; 2ME, 2-mercaptoethanol; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; PerCP, perdinin chlorophyll protein; PWM, pokeweed mitogen

分画のみがこの機能を有するのかは明らかではない．

新生児期，乳児期においては肺炎双球菌などのポリサッカライド抗原に対する反応が欠如しており，この時期における特異抗体産生能が未熟であることが示唆されている．また，出生前における子宮内感染例においても産生される特異抗体が IgM に限られることから，新生児期においては Ig クラススイッチが極めて乏しいと考えられてきた．さらに新生児臍帯血を用いた試験管内の研究でも，種々の刺激により産生される Ig の殆どが IgM[19]のみであることから，新生児B細胞による Ig 産生は IgM に限られると考えられてきた．

一方，新生児B細胞は表面に IgM および IgD を同時に発現し，抗原未感作のいわゆるナイーブ細胞の形質を有している[20]．表面 IgD の発現は加令と共に変化し，次第に IgD を発現しない，いわゆるメモリーB細胞が増加する．特異抗体を産生，あるいは IgG, IgA を産生するB細胞はこの分画に含まれると考えられている．さらに，新生児T細胞のほとんどは CD45RO$^-$ のナイーブの形態を有しており，特異抗原に反応せず，B細胞の分化やクラススイッチに重要な役割を果たすと考えられている種々のサイトカイン産生が，成人に比し極めて乏しいことが知られている[21]．新生児期における Ig 産生の低値は，このようにBおよびT細胞のいずれもが機能的に未熟であることに大きく起因していると考えられてきた．

しかし最近，適切な刺激，すなわち十分量のサイトカインシグナルと，CD40 を介した膜刺激により新生児B細胞による IgG あるいは IgA 産生の誘導が可能であるとの報告もあり，適切な抗原刺激環境下では新生児B細胞のクラススイッチが誘導されうることが示唆されている[8)~10)]．本研究では，ポークウイードマイトジェン (pokeweed mitogen, PWM) 刺激系を用いて新生児B細胞に成人メモリー CD4$^+$T 細胞を添加し培養，IgM のみでなく IgG, IgA の産生誘導が可能か否かを検討した．さらにメモリー CD4$^+$T 細胞を末梢血ホーミングレセプター，L-セレクチンの発現に基づいて2つの亜分画に分離し[22]，新生児B細胞による IgG および IgA の産生誘導能を比較検討した．

対象および方法

Ⅰ．モノクローナル抗体 (monoclonal antibody, mAb) および抗 Ig 精製抗体

フルオレスセイン・イソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗 Leu-3a (抗 CD4) mAb，フィコエリスリン (phycoerythrin, PE) 標識抗 Leu-16 (抗 CD20) および抗 Leu-45RO (抗 CD45RO) mAb，ペリジニンクロロフィル蛋白 (perdinin chlorophyll protein, PerCP) 標識抗 Leu-3a (抗 CD4) mAb は Becton Dickinson Immunocytometry Systems (San Jose, CA, USA) から，FITC 標識抗 UCHL-1 (抗 CD45RO) mAb は DAKO Japan Co (京都), PE 標識の TQ1 (抗 L-selectin) および 2H4 (抗 CD45RA) mAb は Coulter Immunology (Hialeah, FL, USA) から購入した．PWM は，Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA) から入手した．FITC 標識家兎抗ヒト IgA, IgG, IgM，および IgD 抗体は，Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, AL, USA) から購入した．酵素結合免疫吸着定量法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) で使用する未標識ならびにアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgM, IgG および IgA 抗体は，TAGO Inc. (Burlingame, CA, USA) のものを使用した．

Ⅱ．末梢リンパ球の分離

臍帯血は，正常満期産児の胎盤側臍帯静脈より採取した．また，生後1か月の新生児から15歳までの健康小児，および23－37歳までの健康成人よりヘパリン加静脈血を得た．リンホプレップ (lymphoprep, Nycomed AS, Oslo, Norway) を用いた比重遠心法により末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) を単離下．さらに，2-アミノエチルイソチオウロニウム ブロマイド (2-aminoethylisothiouronium bromide, AET ; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 処理ヒツジ赤血球を用いた E-ロゼット沈殿法にて E-ロゼット形成 (E$^+$) 細胞と E-ロゼット非形成 (E$^-$) 細胞に分離した[23]．

E$^-$ 細胞を5％非働化ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS ; Nipro，大阪) を含む RPMI1640 培養液 (Gibco Labortories) に浮遊し 75cm^2 培養用フラスコ (No. 3375 : Costar, Cambrige, MA, USA) 中で37℃30分間インキュベートした．振盪後，フラスコから非付着細胞を得てB細胞を精製するために使用した．付着細胞は，5％ FCS 入り RPMI1640 で洗浄の後，セルスクレイパー (No. 3010 : Costar) にて剝離し単球として用いた[14]．

Ⅲ．フローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原発現の解析

異なる年齢のヘパリン加静脈血 1ml を 0.1M リン酸緩衝塩化ナトリウム液 (phosphate-buffered saline, PBS) にて2回洗浄し，FITC 標識抗 IgD 抗体と PE 標識抗 Leu-16 抗体を添加後20分染色し，PBS で洗浄後再浮遊した．さらに，種々の年齢の小児末梢血単核球を分離し，FITC 標識抗 Leu-45RO 抗体，PE 標識抗 TQ1, PerCP 標識抗 Leu-3a 抗体で三重蛍光標識した．解析には，Cytoron Absolute (Ortho Diagnostic Systems, K. K., 東京) を用いた[24]．

Ⅳ．セルソーターを用いたT細胞ならびにB細胞亜群の単離

CD4 陽性細胞を Epics Elite (Coulter Electronics Inc., Hialeah, FL, USA) を用いて CD45RA (2H4) 陰性のメモリー CD4$^+$T 細胞および CD45RO (PE) 陰性のナイーブ CD4$^+$T 細胞[25]をそれぞれ単離した．さらに CD45RA 陰性メモリー CD4$^+$T 細胞は，PE 標識抗 L-セレクチン抗体 (TQ1) で蛍光染色し同様に L-セレクチン陽性および L-セレクチン陰性メモリー CD4$^+$T 細胞に分画した．なお，非付着細胞は，PE 標識抗 Leu16 抗体と FITC 標識抗ヒト IgD 抗体を添加染色し，ナイーブB細胞 (surface IgD$^+$CD20$^+$) とメモリーB細胞 (sIgD$^-$CD20$^+$) に分離した．各々のセルソーテイングは2回繰り返し，それぞれの細胞分画の純度は99.5％以上であった．

Ⅴ．細胞培養

培養液は，10％非働化ウシ胎児血清，20mM HEPES, 2×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol, 2ME), 0.3mg/ml グルタミン，200U/ml ペニシリン G, 10μg/ml ゲンタマイシンを含む RPMI1640 培養液を用いた．96穴平底マイクロタイタープレート (No. 25860 : Corning Glass Works, NY, USA) の一穴あたり 2×10^4 個のB細胞と 4×10^4 個の各 CD4$^+$T 細胞亜群，6×10^3 個の自己単球と200倍希釈の PWM を総容量 200μl として分注し培養した．すべての培養は37℃，5％炭酸ガス培養器内でおこなった．14日間培養後，上清中の免疫グロブリン濃度を ELISA 法により定量した．

細胞質内免疫グロブリンの蛍光抗体法による検出のために，培養開始7日後の細胞を採取し2回 PBS で洗浄した．さらに AET 処理羊赤血球を用いた E-ロゼット沈殿法にて E$^+$ 細胞を

除去し，サイトスピン標本を作成した．

Ⅵ．培養上清中 Ig の測定

培養上清中 Ig の濃度は ELISA 法で測定した[26]．ELISA 用96穴平底マイクロタイタープレート (Flow Laboratories, Mclean, VA, USA) を，0.02%アジ化ナトリウム含有 pH9.6, 0.05 M 炭酸緩衝液で希釈した未標識ヤギ抗ヒト IgG, IgM または IgA 抗体 (TAGO) で室温2時間反応させた．0.05%ツイーン-20 (Sigma Chemical Co.) および0.02%アジ化ナトリウム含有 PBS (PBS-ツイーン) にて洗浄した後，1%FCS 加 PBS-ツイーンで段階希釈した培養上清，あるいは既知濃度の標準の Ig を加え室温で2時間反応させた．

さらに，PBS-ツイーンで洗浄後，PBS-ツイーンで希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト Ig 抗体 (TAGO) を加え室温で2時間反応させた．その後，PBS-ツイーンで洗浄し，最後に pH9.8 のジエタノールアミン緩衝液 1mg/ml に調節した p-ニトロフェニルリン酸 (p-nitrophenyl phosphate) (Sigma Chemical Co.) を添加し発色させた．呈色反応を酵素免疫測定装置，EAR400 (SLT-lab. instruments, Salzbuzg, Austria) により波長 405nm で測定し，既知濃度の標準ヒト血清 Ig 曲線より培養上清の Ig 濃度を算出した．

なお本測定の感度は IgG と IgA は 5ng/ml, IgM は 10ng/ml であった．

Ⅶ．Ig 産生細胞の蛍光抗体による染色

サイトスピン標本をよく風乾した後，5%酢酸加95%エタノールで−20℃，約30分間固定を行った．固定した標本はよく PBS で洗浄し，FITC 標識の IgM, IgG および IgA で湿潤箱の中，室温で30分間染色した．蛍光染色した標本は蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) で観察し，培養 E^- 細胞中の Ig 産生細胞の比率を算出した[23]．

成　　績

Ⅰ．$CD4^+T$ 細胞による新生児B細胞の Ig 産生誘導

PWM はT細胞依存性のヒトB細胞刺激因子であり，ポリクローナルな Ig 産生を誘導することが知られている[27]．本研究ではまず，新生児ならびに成人B細胞に新生児 $CD4^+T$ 細胞，あるいは成人 $CD4^+T$ 細胞を添加，PWM 刺激下で培養，各 Ig アイソタイプの産生を検討した．

成人B細胞と成人 $CD4^+T$ 細胞を混合培養した場合には，IgM, IgG および IgA すべてのアイソタイプの十分な産生を認めた．一方，成人B細胞に新生児 $CD4^+T$ 細胞を添加して培養した場合には，殆ど Ig 産生は認められなかった．さらに，新生児B細胞に新生児 $CD4^+T$ 細胞を添加して培養した場合にも，IgM, IgG および IgA のいずれの産生も認めなかった．これに対して，新生児B細胞に成人 $CD4^+T$ 細胞を添加して培養すると，有意なレベルの IgM の産生を認め，IgG, IgA の産生もわずかであるが認められた (表1)．

Ⅱ．メモリー $CD4^+T$ 細胞による新生児B細胞の IgG, IgA 産生の誘導

Table 1. Effect of unfractionated $CD4^+$ T cells from newborns and adults on PWM-induced Ig production by B cells

B cell source	Added $CD4^+T$ cells	Ig level (ng/ml) IgM	IgG	IgA
Newborn	None	<10	<5	<5
	Newborn	53±8	<5	<5
	Adult	4,851±886	334±61	29±5
Adult	None	26±11	16±7	47±22
	Newborn	53±8	<5	<5
	Adult	13,218±1,650	5,128±570	6,713±570

$CD20^+$ B cells (2×10^4/well) purified from newborns and adults were combined with autologous monocytes (6×10^3/well) and cultured alone or with unfractionated $CD4^+$ T cells (4×10^4/well) from both donors at a 1 : 200 dilution of pokeweed mitogen (PWM). Culture supernatants were collected on day 14 for quantitation of Ig secretion by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The data are expressed as the mean ± SEM for 5 experiments.

Table 2. Memory $CD4^+$ T cells promote Ig production by neonatal B cells[a]

Adult $CD4^+T$ cells	Ig level (ng/ml) IgM	IgG	IgA
None	<10	<5	<5
Unfractionated	6,698±1,370	227±40	28±10
Memory	15,859±2,468*	1,079±267*	75±8*
Naive	421±110	<5	<5

[a] Naonatal B cell (2×10^4/well) were recombined with autologous monocytes (6×10^3/well) and cultured with unfractionated, memory ($CD45RA^-$) or naive ($CD45RO^-$) $CD4^+$ T cells (4×10^4/well) from the adult donor in the presence of PWM. Supernatants were collected on day 14 for quantitation of Ig secretion by ELISA. The data are expressed as the mean±SEM for 5 experiments.

* Significant difference in Ig levels compared with unfractionated $CD4^+$ T cells (paired Student's t-test, $p<0.001$).

CD4⁺T 細胞の中で，CD45RO 抗原を発現するメモリー CD4⁺T 細胞が強いB細胞分化促進作用を有することが知られている[12)13)]．そこで成人T細胞を CD45RO あるいは CD45RA 発現によりメモリーおよびナイーブ CD4⁺T 細胞に分離し，それぞれを新生児B細胞に添加培養し，Ig 産生の誘導を検討した．成人メモリー CD4⁺T 細胞を用いた場合，未分画 CD4⁺T 細胞を用いた場合より有意に高いレベルの Ig 産生を認めた．この傾向は IgM 産生のみでなく，IgG あるいは IgA 産生に関しても同様に認められた．一方，ナイーブ CD4⁺T 細胞を用いた場合には少量の IgM 産生が誘導されるのみであり，IgG あるいは IgA の産生は全く認められなかった（表2）．

Ⅲ．蛍光抗体法による Ig 産生細胞の染色

新生児B細胞に成人メモリー CD4⁺T 細胞を添加，PWM 刺激下で培養し，培養7日目に細胞質内 Ig 産生細胞を蛍光抗体法で検討した．図に代表的な蛍光抗体染色の写真を示す．新生児B細胞の培養での IgM 産生細胞は成人B細胞の場合に匹敵する程度認めた（図 1A, D）．極めて重要なことは，成人に比し数は少ないが IgG および IgA 産生細胞も確かに認められたことである（図 1B, C, E, F）．表3に培養 E⁻ 細胞中の各 Ig 産生細胞の比率の平均を示す．

Ⅳ．年齢によるメモリー CD4⁺T 細胞の L-セレクチン発現の変化

L-セレクチンはナイーブT細胞のほとんど全てに発現し，メモリー CD4⁺T 細胞の一部で発現する[28)29)]．T細胞中のメモリー CD4⁺T 細胞の頻度は加齢とともに増加する[18)]ことが知られているが，メモリー CD4⁺T 細胞中の L-セレクチン陰性分画の割合が加令とともにどのように変化するかは不明である．そこで異なる年齢でのメモリー CD4⁺T 細胞中の L-セレクチン発現を，三重標識免疫蛍光法を用いて検討した．PerCP 陽性領域に含まれる CD4⁺T 細胞に関して，FITC 標識抗 CD45RO 抗体および PE 標識 TQ1 抗体による二重蛍光染色パターンを解析した．

各年齢群の代表的な解析パターンを示す（図2）．新生児期にはメモリー CD4⁺T 細胞の多くは L-セレクチン陽性であり陰性

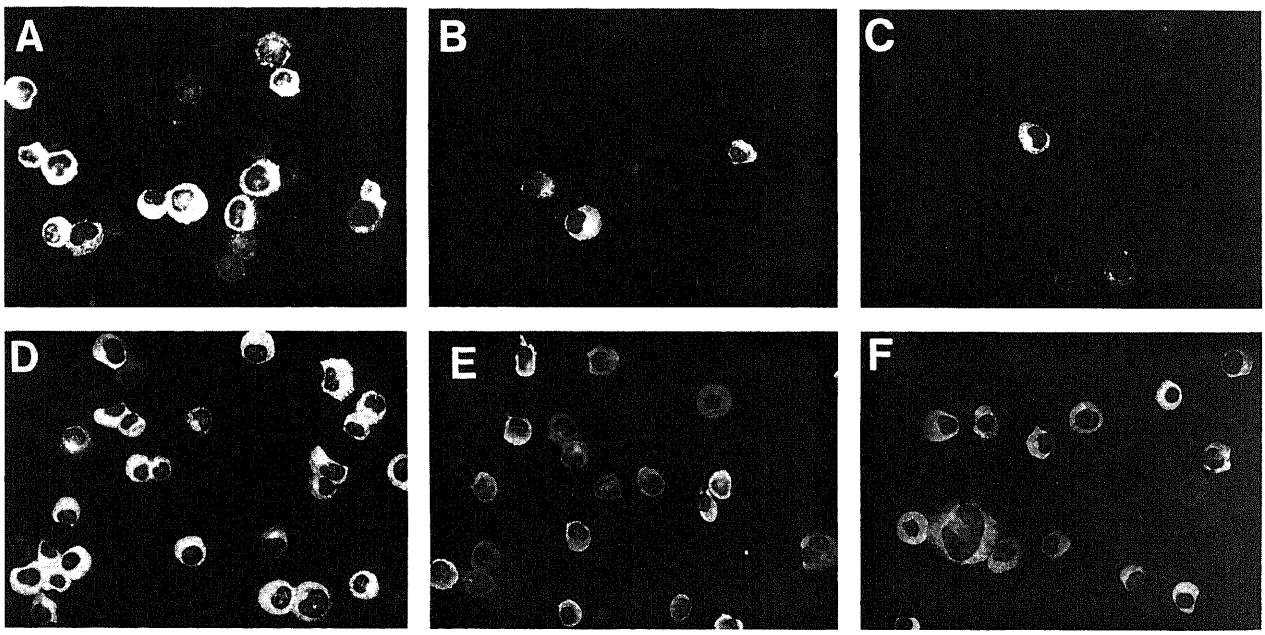

Fig. 1. Detection of IgM-, IgG- or IgA-producing cells in cultures of neonatal (A-C) and adult (D-F) B cells combined with memory CD4⁺ T cells. Purified B cells were cultured with memory CD4⁺ T cells from unrelated adult donors in the presence of pokeweed mitogen (PWM). The cultured cells were harvested on day 7, depleted of E-rosetting T cells, and deposited on to the glass slides by cytocentrifugation. Cytocentrifuged cell preparations were stained for cytoplasmic IgM (A and D), IgG (B and E) or IgA (C and F) using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibodies specific for each isotype.

Table 3. The percentage of Ig-producing cells among PWM-stimulated neonatal and adult B cells

B cell source	% of Ig-producing cells			
	IgM	IgG	IgA	Total
Neonate	31.9±15.1	1.8±0.9	0.6±0.3	34.3±0.3
Adult	21.1±12.1	32.3±7.2	15.9±1.2	73.5±17.9

FACS-sorted neonatal and adult B cells were cultured with adult CD45 RA-memory T cells for 7 days in the presence of PWM and autologous adherent cells. E⁻ cells were collected from the culture and cytospin preparations were stained for IgG, IgM and IgA. And the percentage of Ig-producing cells were calculated. The data are expressed as the mean ± SD for 4 experiments.

細胞はほとんど認められなかった．メモリー CD4⁺T 細胞中の L-セレクチン陰性分画の割合は加令とともに増加し，成人では2峰性の分布を示した．なお表4は，異なる年齢におるメモリー CD4⁺T 細胞中の L-セレクチン陰性細胞の比率を求めたものである．新生児期ないし，乳児期前半にはメモリー CD4⁺T 細胞中の L-セレクチン陰性細胞の比率は約9％であったが，加令とともに増加し，7歳前後には約20～25％に達した．

V．L-セレクチン陽性メモリー CD4⁺T 細胞による新生児B細胞の Ig 産生誘導

以上のように，メモリー CD4⁺T 細胞における L-セレクチン発現が加令と共に変化するという事実は，L-セレクチン発現が新生児・乳児期におけるナイーブB細胞の分化誘導能獲得に関与している可能性を示している．そこで，成人メモリー CD4⁺T 細胞を L-セレクチンの発現により分離し，新生児B細胞に添加，PWM 刺激下で培養し，いずれの分画がより効果的に Ig 産生を誘導するか検討した（表5）．L-セレクチン陽性メモリー CD4⁺T 細胞を添加した場合に L-セレクチン陰性メモリー CD4⁺T 細胞を添加培養した場合より明らかに強い Ig 産生が誘導された．この傾向は IgM のみでなく，IgG, IgA 産生に関しても同様に認められた．

VI．L-セレクチン陽性あるいは L-セレクチン陰性メモリー CD4⁺T 細胞によるナイーブB細胞ならびにメモリーB細胞の Ig 産生誘導

未分画 CD4⁺T 細胞を用いたこれまでの報告では，CD4⁺T 細胞中の L-セレクチン陰性細胞がより強いB細胞分化誘導能を有するとされている[30)～32)]．新生児B細胞を用いた検討では，これら従来の報告と異なり，むしろ L-セレクチン陽性分画に強いB細胞分化誘導能が観察された．一方，成人末梢血中のB細胞は，表面 IgD の発現の有無により異なる亜群に分画される[33)34)]．すなわち，抗原未感作のナイーブB細胞が表面 IgD 陽性であるのに対して，抗原感作を受けた，メモリーB細胞は表面 IgD の発現を欠くことが知られている．

そこでさらに，成人B細胞を IgD の発現の有無により分画，異なるメモリー CD4⁺T 細胞亜群を添加して培養，Ig 産生誘導を検討した（表6）．メモリー（IgD 陰性）B細胞の培養では，メモリー CD4⁺T 細胞を添加しない場合でも少量の Ig 産生が認められ，これらの細胞群の中にすでに Ig を産生，分泌する細胞が含まれていることが示唆される[34)]．メモリーB細胞にメモリー

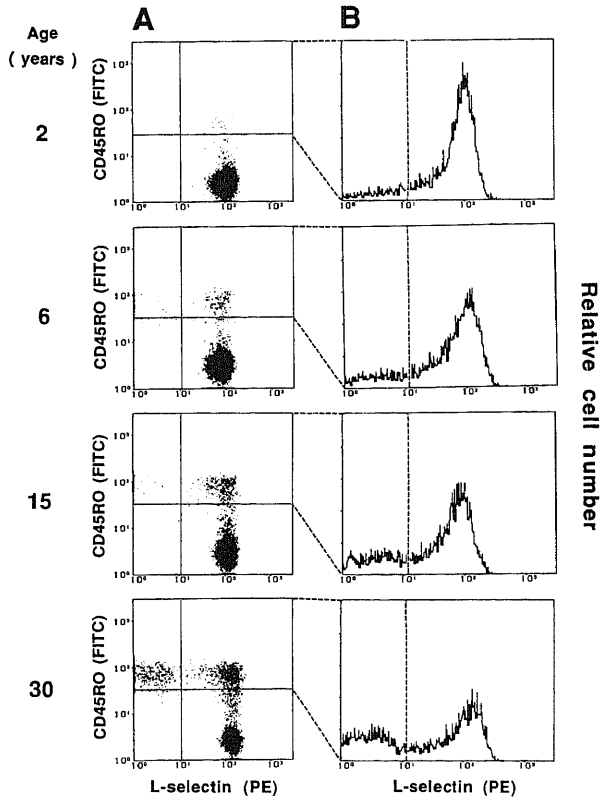

Fig. 2. Three-color analysis of L-selectin expression on memory (CD45RO⁺) CD4⁺ T cells. Mononuclear cells (MNC) from three children of various ages and an adult person were stained for CD45RO, L-selectin and CD4 in a three-color manner, and analyzed on a Cytoron Absolute flow cytometer. *A*, cytograms shows two-color patterns of CD45RO (FITC) and L-selectin (PE) expressed on CD4⁺ T cells gated by PerCP staining. *B*, the second gate was set to include the whole poputation of brightly CD45RO-positive cells and 5,000 cells accumulating within the gate were analyzed for L-selectin expression, which is represented as the histogram. The *dashed vertical lines* indicate the control.

Table 4. Developmental changes of % L-selectin-negative cells in memory CD4⁺ T cells

Number of Age	samples	% L-selectin-negative cells within memory CD4⁺T cells[a)]	*p* values[b)]
<6 Months	5	9.2±2.0	<0.0001
7-11 Months	5	10.4±1.7	<0.0001
1-3 Years	11	18.3±1.5	<0.001
4-6 Years	11	21.4±2.2	<0.02
7-15 Years	11	24.1±2.3	N.S.[c)]
Adult	13	29.2±2.1	

[a)] Monouclear cells (MNC) from children of various ages and adults were simultaneously stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD45RO, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-L-selectin and perdinin chlorophyll protein (PerCP)-conjugated anti-CD4 mAb. The percentages of L-selectin-negative cells within memory (CD45RO⁺) CD4⁺ T cells were evaluated by three-color immunofluorescence analysis.
[b)] Compared with the adult value by unpaired Student's *t*-test.
[c)] N.S., not significant.

Table 5. Efficient induction of neonatal B cell Ig production by L-selectin-positive memory CD4+ T cells

Experiment number	Added memory CD4+T cells	Ig level (ng/ml)		
		IgM	IgG	IgA
1	L-selectin+	25,040	1,422	83
	L-selectin−	5,108	258	<5
2	L-selectin+	19,490	913	180
	L-selectin−	6,598	230	45
3	L-selectin+	11,340	886	170
	L-selectin−	2,404	308	34
4	L-selectin+	3,519	110	26
	L-selectin−	74	<5	<5

Neonatal B cells (2×10^4/well) were recombined with autologous monocytes (6×10^3/well) and cultured with L-selectin-positive or -negative memory CD4+ T cell populations (4×10^4/well) from the adult donor in the presence of PWM. Culture supernatants were collected on day 14 for quantitation of Ig secretion by ELISA.

Table 6. Differential effects of L-selectin-positive and -negative memory CD4+ T cells on Ig production by sIgD+ and sIgD−B cells from adults

Experiment number	Added memory CD4+T cells	Ig level (ng/ml)					
		sIgD+B cells			sIgD−B cells		
		IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA
1	None	<10	<5	<5	2,253	583	635
	Memory	3,780	133	198	25,878	7,308	9,200
	L-selectin+	7,569	176	466	8,579	2,221	1,706
	L-selectin−	1,260	68	60	36,699	13,459	11,613
2	None	<10	<5	<5	1,052	630	260
	Memory	7,910	720	444	11,889	7,134	4,185
	L-selectin+	8,140	860	637	9,837	6,327	3,492
	L-selectin−	3,298	180	156	22,482	14,616	6,375

Adult CD20+ B cells were separated into two populations according to sIgD expression. Each B cell population (2×10^4/well) was recombined with autologous monocytes (6×10^3/well) and cultured with L-selectin-positive or-negative memory CD4+ T cell populations (4×10^4/well) from unrelated adults in the presence of PWM. Supernatants were harvested on day 14 for quantitation of Ig secretion by ELISA.

CD4+T 細胞を添加し培養すると，IgM, IgG, IgA 全てのアイソタイプに関して十分な産生誘導が認められた．メモリーB細胞に L-セレクチン陰性メモリー CD4+T 細胞を添加した場合に，未分画メモリー CD4+T 細胞を添加した場合に比し，さらに強い Ig 産生誘導が認められた．L-セレクチン陽性分画を添加した場合には，Ig 産生誘導は未分画メモリー CD4+T 細胞を用いた場合に比し明らかに低値を示した．

対照的に，表面 IgD 陽性のナイーブB細胞を用いた場合には，メモリー CD4+T 細胞の添加なしでは殆ど Ig 産生が認められなかった．さらに重要なことは，新生児B細胞の場合と同様，ナイーブB細胞による Ig 産生の誘導は，L-セレクチン陰性より L-セレクチン陽性メモリー CD4+T 細胞亜群を用いたときに著明であった．

考　　察

PWM，ノカルジア抗原 (nocardia water soluble mitogen) などのT細胞依存性B細胞活性化因子を用いた場合のみでなく，黄色ブドウ球菌 Cowan I 株，Epstein-Barr ウイルスなどのB細胞マイトーゲンを用いた場合でも，新生児リンパ球の培養では主として IgM 産生のみが誘導されることが報告されており，従来新生児B細胞による Ig 産生は IgM に限られると考えられていた[35)~38)]．しかし Splawski ら[39)]は最近，抗 CD3 抗体で固相化し成人T細胞と新生児B細胞を混合培養することによりすべてのアイソタイプの Ig 産生を誘導できることを報告，さらに抗 CD3 抗体で固相化した実験では，IL-2, IL-4 および IL-6 のようないくつかのT細胞由来のサイトカインが，新生児B細胞による Ig 産生を誘導することも見いだした[40)]．また，Tucci らは突然変異した EL-4 胸腺腫細胞とT細胞上清を用いた独特な培養方法を駆使し，新生児B細胞が IgM のみでなく IgG, IgA 産生能を有することを示した[41)]．これらの結果は，適切な刺激条件により新生児B細胞による IgG ならびに IgA 産生誘導が可能であることを示している．

ヒトB細胞の Ig 産生細胞への分化誘導には，CD45RO 抗原を発現するメモリー CD4+T 細胞の役割が重要であると考えられている[11)~14)]．本研究においても，T細胞依存性のB細胞マイトジェンである PWM 刺激培養系を用いて，新生児B細胞を成人メモリー CD4+T 細胞に添加培養することによって IgM のみならず，IgG ならびに IgA の産生を誘導できた．一方，成人末梢血を用いた場合には，ナイーブ (表面 IgD 陽性) とメモリー (表面 IgD 陰性) B細胞による Ig 産生が著明に異なることが知

られている．成人メモリーB細胞にメモリー CD4+T 細胞を添加培養すると，全てのアイソタイプの Ig 産生が強く誘導されるのに対して，ナイーブB細胞の培養では新生児B細胞の場合と同様，メモリー CD4+T 細胞の添加によっても産生される Ig 濃度は低く，特に IgG ならびに IgA の産生は乏しい．本研究ではこのような新生児B細胞，あるいは成人ナイーブB細胞の分化誘導に，メモリー CD4+T 細胞の特定の亜群が重要な役割を果たしている可能性を検討した．

末梢血 CD4+T 細胞のうちナイーブ CD4+T 細胞はその殆どすべてが L-セレクチンを発現するが，メモリー CD4+T 細胞では，その一部が L-セレクチン陰性であることが知られている．今回の検討では，乳児期ではメモリー CD4+T 細胞の L-セレクチン発現が極めて強く，陰性亜群が極めてわずかしか存在しないこと，また加令に伴い，このような亜群は次第に増加，成人ではメモリー CD4+T 細胞の L-セレクチン発現が二峰性の分布を示すようになることが明らかとなった．従来の報告では，CD4+T 細胞中の L-セレクチン陰性亜群に，強いB細胞分化能があるとされている．本研究ではメモリー CD4+T 細胞をさらに L-セレクチン発現により分画，陽性亜群と陰性亜群でそのB細胞分化誘導能を比較検討した．メモリー(表面 IgD 陰性) B細胞の培養では，L-セレクチン陰性亜群により強く Ig が誘導された．一方，予想に反して，新生児B細胞あるいは成人ナイーブ(表面 IgD 陽性) B細胞の培養では，L-セレクチン陽性亜群を添加した際に，より強い IgM 産生が誘導され，さらに著明な IgG ならびに IgA 産生も観察された．Tedder らは末梢血B細胞を用いて同様の検討を行ない，L-セレクチン陰性亜群より L-セレクチン陽性亜群により強いB細胞分化誘導能があると報告している[28]．しかし彼らの報告では，成人末梢血B細胞を未分画の状態で用いており，ナイーブおよびメモリーB細胞の差異を検討していない．これらのことより，本研究の結果は，L-セレクチン陽性亜群がナイーブB細胞のクラススイッチ，すなわち IgG ならび IgA 産生誘導に重要な役割を有する可能性を強く示唆している．一方，メモリーB細胞による Ig 産生は L-セレクチン陰性亜群の添加でより強く誘導されており，これらの異なるT細胞亜群が，異なるB細胞に対して相違する活性化シグナル，あるいは分化誘導機構を有している可能性が示唆される．

L-セレクチンは末梢リンパ節への特異的なホーミングレセプターであることが知られ，特にナイーブ CD4+T 細胞の選択的ホーミングに関与していると考えられている．一方，L-セレクチンは炎症局所に侵潤する CD45RO 陽性メモリー CD4+T 細胞においても発現することが知られており[22]，生体内における活性化に伴い，その発現が増強すると考えられる．Picker ら[42]は L-セレクチン陽性および陰性T細胞の組織特異的な分布を検討し，L-セレクチン発現を欠如するT細胞は粘膜指向性があり，L-セレクチン発現するメモリー CD4+T 細胞は局所リンパ節，皮膚指向性があることを示した．さらに最近の報告では，L-セレクチン陽性細胞がリンパ節，扁桃などにおいて抗原感作を受け，活性化されたばかりの細胞である可能性を示唆している．B細胞は抗原と遭遇することにより，T細胞との物理的接触を介して活性化される．活性化されたB細胞においてクラススイッチが起こるために，T細胞から2つのシグナルが必要であると考えられている．すなわち，T細胞により産生されるサイトカインによるシグナルと，T細胞－B細胞間直接接触による相互作用である[43]．B-T 間相互作用において種々の膜接着抗原，特にB細胞 CD40 抗原と活性化T細胞に発現するそのリガンド，gp39 蛋白あるいは CD40 リガンド (CD40-L) の役割が注目されている．また最近，CD40-L に対する mAb を用いて，PWM 刺激系におけるB細胞分化誘導に CD40-L と CD40 の間の相互作用が極めて重要であることが示されている[44][45]．ナイーブB細胞の分化誘導には，特に CD40, CD40L を介した B, T 細胞間相互作用が特に重要であることが予想される．L-セレクチン陽性亜群がナイーブB細胞の分化により強く誘導した事実より，この亜群に CD40-L が選択的に発現している可能性も考えられる．しかし，Gauchat らは最近ナイーブおよびメモリーT細胞のいずれも活性化により同程度の CD40-L を発現すると報告しておりT細胞亜群間に CD40L 発現の差を認めない[46][47]．さらに本研究においても，予備的検討で L-セレクチンの発現に関わらず，メモリー CD4+T 細胞によるB細胞分化誘導を，抗 CD40 mAb が完全に抑制した．従って，L-セレクチン陽性メモリー CD4+T 細胞に CD40-L が選択的に発現され，Ig 産生誘導能の差を規定している可能性は少ないと考えられる．一方，メモリー CD4+T 細胞は IL-4, IL-5, IL-10 そして IFN-γ を主として産生し，クラススイッチの調節に関与していると考えられているが[14][15]，これらのサイトカインのうち，ナイーブB細胞の分化とクラススイッチに関与する特定のサイトカイン，すなわち IL-4, IL-5, IL-10 などが，L-セレクチン陽性メモリー CD4+T 細胞により選択的に産生される可能性もあり，今後の検討が必要である．

以上，クラススイッチを含むナイーブB細胞に関わる誘導作用は，メモリーB細胞の分化，成熟に関わるものとは質的に異なることが示唆される．このような質的差異には L-セレクチン陽性メモリーT細胞が強く関与する可能性があるが，関与するサイトカインおよびT細胞－B細胞相互作用機構の差異は，まだ明らかにされておらず，今後解決すべき問題として残される．

結　　論

1．メモリー CD4+T 細胞は L-セレクチン発現の有無により，L-セレクチン陽性，陰性の亜群に大別することができ，年令の進むにつれ L-セレクチン陰性亜群の比率は高まる．

2．L-セレクチン陰性メモリー CD4+T 細胞亜群は，PWM 刺激培養系における sIgD- 成熟B細胞の Ig 産生に強いヘルパー活性を示す．一方，sIgD+ 未熟B細胞の IgM を主とする Ig 産生は，L-セレクチン陽性メモリー CD4+T 細胞により，より強い促進を受ける．

3．新生児B細胞の Ig 産生は，成人の L-セレクチン陰性メモリー CD4+T 細胞存在下では不良で，IgM を主とし，測定感度以下ないしは僅かな IgG, IgA の産生がみられるに過ぎないが，L-セレクチン陽性メモリー CD4+T 細胞存在下では，IgM のみならず IgG, IgA の産生も著しく増強された．

4．以上の成績は，新生児B細胞や成人の未熟 B (sIgD+) 細胞におけるクラススイッチの誘導には，メモリー CD4+T 細胞のなかでも L-セレクチン陽性亜群の関与が大きいことを示唆するものである．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導と御校閲を賜りました恩師谷口　昂教授

に深謝します．また直接御指導頂きました宮脇利男講師，谷内江昭宏助手をはじめ終始研究に御協力頂きました小児科免疫グループ，遺伝子グループの諸兄，技術補助員の西沢里美さん，寺畑貴巳子さん，松川はるみさん，ならびに教室員の皆様方に感謝致します．さらに快く新生児臍帯血を御提供下さいました金沢聖霊病院産婦人科の大下睦郎先生に深謝致します．

なお，本研究の一部は文部省科学研究費，厚生省特定疾患免疫不全症候群調査研究費によったことを付記する．本論文の一部は第96回日本小児科学会学術集会（横浜1993），第23回日本免疫科学会総会・学術集会（仙台1993）において発表した．

文　献

1) **Honjo, T.**: Immunoglobulin genes. Annu. Rev. Immunol., 1, 499-528 (1983).

2) **Esser, C. & Radbruch, A.**: Immunoglobulin class switching: Molecular and cellular analysis. Annu. Rev. Immunol., 8, 717-735 (1990).

3) **Yuan, D., Dang, T. & Sanderson, C.**: Regulation of Ig H chain gene transcription by IL-5. J. Immunol., **145**, 3491-3496 (1990).

4) **Snapper, C. M., McIntyre, T. M., Mandler, R., Pecanha, L. M. T., Finkelman, F. D., Lees, A. & Mond, J. J.**: Induction of IgG3 secretion by interferon γ: A model for T cell-independent class switching in response to T-cell independent type 2 antigens. J Exp. Med., **175**, 1367-1371 (1992).

5) **Van Vlasselaer, P., Punnonen, J. & De Vries, J. E.**: Transforming growth factor-β directs IgA switching in human B cells. J. Immunol., **148**, 2062-2067 (1992).

6) **Noelle, R. J., Daum, J., Bartlett, W. C., McCann, J. & Shepherd, D. M.**: Cognate interactions between helper T cells and B cells. V. Reconstitution of T helper cell function using purified plasma membrances from activated Th1 and Th2 helper cells and lymphokines. J. Immunol., **146**, 1118-1124 (1991).

7) **Noelle, R. J., Roy, M., Shepherd, D. M., Stamenkovic, I., Ledbetter J. A. & Aruffo, A**: A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **89**, 6550-6554 (1992).

8) **Gascan, H., Gauchat, J.-F., Aversa, G., Van Vlasselaer, P. & De Vries, J. E.**: Anti-CD40 monoclonal antibodies or $CD4^+$T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. J. Immunol., **147**, 8-13 (1991).

9) **Spriggs, M. K., Armitage, R. J., Strockbine, L., Clifford, K. N., Macduff, B. M., Sato, T. A., Maliszewski, C. R. & Fanslow, W. C**: Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell Proliferation and Immunoglobulin E secretion. J. Exp. Med., **176**, 1543-1550 (1992).

10) **Hollenbaugh, D., Grosmaire, L. S., Kullas, C. D., Chalupny, N. J., Braesch-Andersen S., Noelle, R. J., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A. & Aruffo, A.**: The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell costimulatory activity. EMBO J., 11, 4313-4321 (1992).

11) **Morimoto, C., Letvin, N. L., Distaso, J. A., Aldrich, W. R. & Schlossman, S. F.**: The isolation and characterization of the human suppresor inducer T cell subset. J. Immunol., **134**, 1508-1515 (1985).

12) **Tedder, T F., Cooper, M. D. & Clement, L. T.**: Human lymphocyte differentiation antigen HB-10 and HB-11. II. Differential production of B cell growth and differentiation factors by distinct helper T cell subpopulations. J. Immunol., **134**, 2989-2994. (1985).

13) **Smith, S. H., Brown, M. H., Rowe, D., Callard, R. E. & Beverley, P. C. L.**: Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody, UCHL1. Immunology, **58**, 63-70 (1986).

14) **Sleasman, J. W., Morimoto, C., Schlossman, S. F. & Tedder, T. F.**: The role of functionally distinct helper lymphocyte subpopu-lations in the induction of human B cell differentiation. Eur. J. Immunol., **20**, 1357-1366 (1990).

15) **Ehlers, S. & Smith, K. A.**: Differentiation of T cell lymphokine gene expression: the in vitro acquisition of T cell memory. J. Exp. Med., **173**, 25-36 (1991).

16) **Kanegane, H., Miyawaki, T., Kato, K., Yokoi, T., Uehara, T., Yachie, A. & Taniguchi, N.**: A novel subpopulation of $CD45RA^+CD4^+$ T cells expressing IL-2 receptor α-chain (CD25) and having a functionally transitional nature into memory cells. Int. Immunol., **3**, 1349-1356 (1991).

17) **Mackay, C. R.**: T-cell memory: the connection between function, phenotype and migration pathways. Immunol. Today, **12**, 189-192 (1991).

18) **Hayward, A. R., Lee, J. & Beverley, P. C. L.**: Ontogeny of expression of UCHL1 antigen on $TcR\text{-}1^+$ (CD4/8) and $TcR\sigma^+$ T cells. Eur. J. Immunol., **19**, 771-773 (1989).

19) **Butler, J. L., Suzuki, T., Kubagawa, H. & Cooper, M. D.**: Humoral immunity in the human neonate. *In* G. Burgio, L. Hanson & A. Ugazio (eds.), Immunology of Neonate, p27-36, Springer-Verlag, Berlin Herdelberg, 1987.

20) **Gathings, W. E., Kubagawa, H. & Cooper, M. D.**: A distinctive pattern of B cell immaturity in perinatal humans. Immunol. Rev., **57**, 107-126 (1981).

21) **Akbar, A. N., Terry, L., Timms, A., Beverley, P. C. L. & Janossy, G.**: Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. J. Immunol., **140**, 2171-2178 (1988).

22) **Tedder, T. F., Penta, A. C., Levine, H. B. & Freedman, A. S.**: Expression of the human leukocyte adhesion molecule, LAM1. Identity with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens. J. Immunol., **144**, 532-540 (1990).

23) **Miyawaki, T, Kubagawa, H., Butler, J. L. & Cooper, M. D.**: Ig isotypes produced by EBV-transformed B cells as a function of age and tissue distribution. J. Immunol., **140**, 3887-3892 (1988).

24) **Uehara, T., Miyawaki, T., Ohta, K., Tamaru, Y., Yokoi, T., S. Nakamura, S. & Taniguchi, N.**: Apoptotic

cell death of primed CD45RO+T lymphocytes in Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. Blood, **80**, 452-458 (1992).

25) **Akbar, A. N., Salmon, M. & Janossy, G.**: The synergy between naive and memory T cells during activation. Immunol. Today, **12**, 184-188 (1991).

26) **Yarchoan, R., Tosato, G., Blaese, R. M., Simon, R. M. & Nelson, D. L.**: Limiting dilution analysis of Epstein-Barr virus-induced immunoglobulin production by human B cells. J. Exp. Med., **157**, 1-14 (1983).

27) **Keightley., R. G., Cooper, M. D. & Lawton, A. R.**: The T cell dependence of B cell differentiation induced by pokeweed mitogen. J. Immunol., **117**, 1538-1544 (1976).

28) **Tedder, T. F., Matsuyama, T., Rothstein, D., Schlossman, S. F. & Morimoto, C.**: Human antigen-specific memory T cells express the homing receptor (LAM-1) necessary for lymphocyte recirculation. Eur. J. Immunol., **20**, 1351-1355 (1990).

29) **Picker, L. J., Terstappen, L. W. M. M. H., Rott, L. S., Streeter, P. R., Stein, H. & Butcher, E. C.**: Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T cell subsets in man. J. Immunol., **145**, 3247-3255 (1990).

30) **Reinherz, E. L., Morimoto, C., Fitzgerald, K. A., Hussey, R. E., Daley, J. F. & Schlossman, S. F.**: Heterogeneity of human T4+ inducer T cells defined by a monoclonal antibody that delineates two functional subpopulations. J. Immunol., **128**, 463-468 (1982).

31) **Gatenby, P. A., Kansas, G. S., Xian, C. Y., Evans, R. L. & Engleman, E. G.**: Dissection of immunoregulatory subpopulations of T lymphocytes within the helper and suppressor sublineages in man. J. Immunol., **129**, 1997-2000 (1982).

32) **Kansas, G. S., Wood, G. S., Fishwild, D. M. & Engleman, E. G.**: Functional characterization of human T lymphocyte subsets distinguished by monoclonal anti Leu-8. J. Immunol., **134**, 2995-3002 (1985).

33) **Kuritani, T. & Cooper, M. D.**: Human B cell differentiation. II. Pokeweed mitogen-responsive B cells belong to a surface immunoglobulin D-negative subpopulation. J. Exp. Med., **155**, 1561-1566 (1982).

34) **Jelinek, D. F., Splawski, J. B. & Lipsky, P. E.**: Human peripheral blood B lymphocyte subpopulations: functional and phenotypic analysis of surface IgD positive and negative subsets. J. Immunol., **136**, 83-92 (1986).

35) **Miyawaki, T., Seki, H., Kubo, M. & Taniguchi, N.**: Suppressor activity of T lymphocytes from infants assessed by coculture with unfractionated adult lymphocytes in the pokeweed mitogen system. J. Immunol., **123**, 1092-1096 (1979).

36) **Andersson, U., Bird, G. & Britton, S.**: Cellular mechanisms of restricted immunoglobulin formation in the human neonate. Eur. J. Immunol., **10**, 888-894 (1980).

37) **Ruuskanen, O., Pittard III, W. B., Miller, K., Pierce, G., Sorensen,, R. U. & Polmar, S. H.**: Staphylococcus aureus Cowan I-induced immunoglobulin production in human cord blood lymphocytes. J. Immunol., **125**, 411-413 (1980).

38) **Nagaoki, T., Miyawaki, T., Ciorbaru, R., Yachie, A., Uwadana, N., Moriya, N. & Taniguchi, N.**: Maturation of B cell differentiation ability and T cell regulatory function during child growth assessed in a Nocardia water soluble mitogen-driven system. J. Immunol., **126**, 2015-2019 (1981).

39) **Splawski, J. B., Jelinek, D. F. & Lipsky, P. E.**: Delineation of the functional capacity of human neonatal lymphocytes. J. Clin. Invest., **87**, 545-553 (1991).

40) **Splawski, J. B. & Lipsky, P. E.**: Cytokine regulation of immunoglobulin secretion by neonatal lymphocytes. J. Clin. Invest., **88**, 967-977 (1991).

41) **Tucci, A., Mouzaki, A., James, H., Bonnefoy, J. Y. & Zubler, R. H.**: Are cord blood B cells functionally mature? Clin. Exp. Immunol., **84**, 389-394 (1991).

42) **Picker, L. J., Treer, J. R., Ferguson-Darnell, B., Collins, P. A., Bergstresser, P. R. & Terstappen, L. W. M. M.**: Control of lymphocyte recirculation in man. II. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. J. Immunol., **150**, 1105-1121 (1993).

43) **Purkerson, J. & Isakson, P.**: A two-signal model for regulation of immunoglobulin isotype switching. FASEB J., **6**, 3245-3252 (1992).

44) **Lederman, S., Yellin, M. J., Krichevsky, A, Belko, J., Lee, J. J. & Chess, L.**: Identification of a novel surface protein on activated CD4+T cells that induces contact dependent B cell differentiation (help). J. Exp. Med., **175**, 1091-1101 (1992).

45) **Lederman, S., Yellin, M. J., Inghirami, G., Lee, J. J., Knowles, D. M. & Chess, L.**: Molecular interactions mediating T-B lymphocyte collaboration in human lymphoid follicles. Roles of T cell-B cell-activating molecule (5c8 antigen) and CD40 in contact-dependent help. J. Immunol., **149**, 3817-3826 (1992).

46) **Gauchat, J. F., Aubry, J. P., Mazzei, G., Life, P., Jomotte, T., Elson, G., & Bonnefoy, J. Y.**: Human CD40-ligand: molecular cloning, cellular distribution and regulation of expression by factors controlling IgE production. FEBS Letters, **3**, 259-266 (1993).

47) **Armitage, R. J., Macduff, B. M., Spriggs, M. K. & W. C. Fanslow, W. C.**: Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. J. Immunol., **150**, 3671-3680 (1993).

Induction of IgG and IgA Production in Neonatal B Cells by Memory CD4$^+$ T Cell Subset Expressing L-selectin

Takao Tsuji, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
—J. Juzen Med Soc., **103**, 173—182 (1994)

Key words immunoglobulin production, neonatal B cells, memory CD4$^+$ T cells, L-selectin, class switch

Abstract

Immunoglobulin (Ig) production during the neonatal period is very poor and the isotype is mostly restricted to IgM. Functional immaturity of both B and T cells is regarded as responsible for the characteristic neonatal immune respose. It is known that CD45RO$^+$, memory T cells among CD4$^+$ T cells, provide efficient help for the maturation and differentiation of B cells into Ig-producing cells. Neonatal CD4$^+$ T cells express a negligible level of CD45RO antigen on the cell surface and this lack of memory phenotype at least partly explains the functional immaturity of T cells during neonatal period. In the present study, different subpopulations among memory CD4$^+$ T cells were used to induce IgA and IgG production in neonatal B cells. Negligible production of Igs was observed when neonatal B cells were cultured with naive (CD45RO$^-$) CD4$^+$ T cells in the presence of PWM. In contrast, a significant level of IgM was produced when these B cells were cultured with memory T cells. Importantly, low, but significant levels of both IgG and IgA were also detectable in these cultures. Memory T cells among CD4$^+$ T cells can be further separated into two different subpopulations, based on the expression of the lymphocyte-homing receptor, L-selectin. The differential effects of these subpopulations on the induction of B cell differentiation were compared to each other. An L-selectin-negative subpopulation of memory T cells promoted Ig production most efficiently in surface IgD (sIgD)$^-$ memory B cells. Unexpectedly and in sharp contrast to sIgD$^-$ B cell culture, sIgD$^+$ naive B cells, or neonatal B cells were induced to produce significantly more Igs when an L-selectin-positive subpopulation was added to the culture. In addition to IgM, both IgG and IgA were produced at significant levels. The results suggested that neonatal naive B cells are potentially capable of undergoing class switch and production of IgG and IgA in the presence of appropriate T cell help. Furthermore, it is indicated that L-selectin expression on the memory T cell surface is associated with more potent helper function for the induction of class switch in neonatal B cells. However, exact mechanisms in the T-B interaction of L-selectin-positive and -negative memory CD4$^+$ T cells remain to be elucidated.