

Significance of CD45 Antigen on Differential Maturation of Human Neonatal CD4 Antigen Positive T Cells (CD4 Cells)

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/2297/8215

正 誤 表

金沢大学十全医学会雑誌 第99巻 第4号 749-764 (1990)

749ページ

誤	<p>ヒト新生児 CD4 抗原陽性T細胞 (CD4 細胞) の 機能的分化誘導における CD4 抗原の意義</p> <p>金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授) 笠原善仁 (平成2年7月30日受付)</p>
正	<p>ヒト新生児 CD4 抗原陽性T細胞 (CD4 細胞) の 機能的分化誘導における <u>CD45</u> 抗原の意義</p> <p>金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授) 笠原善仁 (平成2年7月30日受付)</p>

ヒト新生児 CD4 抗原陽性 T 細胞 (CD4 細胞) の 機能的分化誘導における CD4 抗原の意義

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

笠原善仁

(平成2年7月30日受付)

成人 CD4 抗原陽性 T 細胞は CD45 抗原のアイソフォーム (isoform) の発現の違いによりメモリー T 細胞分画とナイーブ T 細胞分画に分割し得る。CD45RO 抗原を認識するモノクローナル抗体 (monoclonal antibody, mAb) UCHL1 陽性の T 細胞は、すでに免疫を受けた可溶性抗原 (リコール抗原) に対し強く反応するメモリー T 細胞であるとされるのに対し、ナイーブ T 細胞は抗 CD45RA mAb で認識される。本研究では、新生児 CD4 細胞における CD45 アイソフォームの発現と、ヘルパー活性、サブレッサー活性や抗 CD3 抗体、抗 CD2 抗体に対する反応性などといった機能との関連につき検討した。フローサイトメトリーを用いて解析すると、新生児 CD4 細胞は、CD45RO 陰性、CD45RA 陽性 (CD45RO⁻, CD45RA⁺) といったナイーブ T 細胞としての表面形質を有していた。その表面形質に一致して新生児 CD4 細胞は成人ナイーブ (CD45RO⁻) CD4 細胞と同様の増殖反応を示した。リコール抗原のひとつである精製ツベルクリン (purified protein derivative, PPD) に対しては、成人メモリー (CD45RO⁺) CD4 細胞は良好に反応するのに対し、新生児 CD4 細胞と成人ナイーブ CD4 細胞とはまったく反応しなかった。抗 CD3 mAb や抗 CD2 mAb で誘導される増殖反応は成人メモリー CD4 細胞で強くみられたが、新生児 CD4 細胞では成人ナイーブ CD4 細胞同様ほとんど認められなかった。抗 CD3 mAb に対する低反応性は抗体を固相化した場合一層顕らかであった。ポークウィードマイトジェン (pokeweed mitogen, PWM) で誘導される B 細胞の免疫グロブリン (immunoglobulin, Ig) 産生に対して、成人メモリー CD4 細胞は強いヘルパー活性を示したが、新生児 CD4 細胞はまったくヘルパー活性を持たないのみばかりか、そのサブレッサー活性は成人ナイーブ CD4 細胞と比較しても非常に強く認められた。Phytohemagglutinin (PHA) にて刺激し、インターロイキン-2 (interleukin-2, IL-2) の存在下で培養すると新生児 CD4 細胞はメモリー細胞としての表面形質 (CD45RO⁺, CD45RA⁻) を示すようになるとともに、B 細胞の Ig 産生の対するヘルパー活性や CD3 分子と CD2 分子を介した刺激による増殖反応性というメモリー細胞の持つ機能を獲得した。培養後の新生児 CD4 細胞は抗 CD3 mAb や抗 CD2 mAb に対し強い反応性を示すようになったが、Ig 産生に対するヘルパー活性は成人メモリー CD4 細胞と比較すると、特に IgA 産生に関しては不十分であった。これに対し、培養に伴う CD45 アイソフォームのメモリー細胞への変化に伴い培養後の成人ナイーブ CD4 細胞はメモリー CD4 細胞と匹敵するヘルパー活性を獲得した。これらの結果から新生児 CD4 細胞は培養前及び培養後においても成人ナイーブ CD4 細胞と同様の表面形質を有しているが、機能的な面では新生児 CD4 細胞は成人ナイーブ CD4 細胞と比較すると免疫学的に未熟であると推測する。

Key words neonatal CD4 cells, CD45 antigen, helper activity, suppressor activity, memory and naive CD4 cells

Abbreviations: Con A, concanavalin A; E⁺, E-rossette forming; E⁻, non E-rossette forming; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FCS, fetal calf serum; FITC, Fluorescein isothiocyanate; ³H-TdR, tritiated thymidine; IFN- γ , interferon- γ ; Ig,

臨床的に新生児は細菌やウイルスなどの感染症に罹患しやすく、新生児や乳児における免疫反応が成人のそれと比較し劣っていることは周知の事実である。ヒト免疫担当細胞の発達は既に胎生早期より認められ、その数や比率は生下時には成人と同様のレベルに達している⁹。新生児期における宿主防御反応の低下は、一部にはB細胞と単球の機能的な発達の未熟性によると考えられるが、T細胞を介した免疫反応の未熟性が新生児期の免疫不全状態におおいに関連している。新生児T細胞はB細胞の免疫グロブリン (immunoglobulin, Ig) 産生細胞への分化に対するヘルパー活性の低下、むしろサプレッサー活性の増強といった機能的特異性を有していることが既に報告され⁹⁻¹¹、さらにマイトジェン刺激によるインターロイキン-2 (interleukin-2, IL-2) 産生能は正常だが、インターフェロン- γ (interferon- γ , IFN- γ) やインターロイキン-4 (interleukin-4, IL-4) 等のサイトカインの産生能は低下していること⁹⁻¹¹も示されている。しかし、この新生児T細胞の機能的未熟性の原因については未だに明らかになっていない。

ヒトのCD4抗原陽性T細胞(CD4細胞)は末梢血T細胞の50~60%を占め、免疫学的制御の中心的役割を担っている¹²。最近、成人CD4細胞がCD45抗原(白血球共通抗原, leukocyte common antigen)の分子量の異なるアイソフォームの発現の違いによりさらにメモリー細胞とナイーブ細胞とに分画し得ると報告される¹³⁻¹⁶。分子量180kDaのCD45アイソフォーム(CD45RO)を認識するUCHL1モノクローナル抗体(monoclonal antibody, mAb)はメモリー細胞を含む抗原刺激を受けたT細胞に発現され、CD45RO陽性の成人CD4細胞分画はメモリー細胞の機能として可溶性のリコール抗原に対し強い増殖反応を示し、かつB細胞のIg産生に対するヘルパー活性を有する¹³。一方、相補的なCD4細胞分画は分子量205~220kDaのCD45アイソフォーム(CD45RA)に対するmAbで認識され、これらの機能を持たないナイーブT細胞と考えられている^{17,18}。また、さらにメモリーCD4細胞とナイーブCD4細胞では幾つかの機能的相違が指摘されている。例えば、メモリーCD4細胞の抗CD3 mAbや抗CD2 mAbで誘導される細胞増殖はナイーブCD4細胞より顕著に強く¹⁹⁻²²、一方自己リンパ球混合培養ではナイーブCD4細胞の方が強く反応す

る¹⁹。マイトジェン刺激に対しどちらの分画も同程度IL-2を産生するが、IFN- γ やIL-4を主に産生するのはメモリーCD4細胞である²³⁻²⁶。Phytohemagglutinin (PHA)で活性化を受けると成人ナイーブCD4細胞はCD45RO抗原を発現するようになり、CD45RA抗原を失いメモリー細胞としての表面形質を有するようになる。これらの免疫学的背景から、本研究では新生児CD4細胞の機能的特異性とCD45アイソフォームの発現の関係につき検討を加え、試験管内でPHAで刺激した時のCD45アイソフォームの発現の変化を解析しそれに伴う機能的分化についても検討を加えた。

対象および方法

I. 末梢血リンパ球の分離

臍帯血は正常満期新生児の臍帯より採取し、生後5日の新生児から17歳までの健康小児および25~35歳までの健康成人よりヘパリン加静脈血を得た。Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed AS, Oslo, Norway)を用いた比重遠心法により末梢血単核細胞を分離した。さらに2-アミノエチルイソチオウロニウムプロマイド(2-aminoethylisothiuronium bromide)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-rossette forming, E⁺)細胞とE-ロゼット非形成(non E-rossette forming, E⁻)細胞に分離した²⁷。末梢血単核細胞を培養用フラスコ(No.3075, Costar, Cambridge, MA, U.S.A.)中で37°C, 60分間インキュベートし、付着細胞を3000 rad放射線照射し、単球として用いた。

II. モノクローナル抗体(mAb)

CD45RO抗原を認識するUCHL1(IgG2a)mAbはDakopatts A/S (Copenhagen, Denmark)より、CD45RA抗原を認識する2H4(IgG1)mAbはフィコエリスリン(phycoerythrin, PE)標識のものをCoulter Immunology (Hialeah, FL, U.S.A.)より入手した。抗Leu3a mAb(IgG1, CD4)、抗Leu2a mAb(IgG1, CD8)、抗Leu16 mAb(IgG1, CD20)はフルオロセチンイソシアネート(fluorescein isothiocyanate, FITC)標識のもの(Beckton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain Views, CA, U.S.A.)を使用した。OKT3 mAb(IgG1, CD3)はジャンセン協和株式会社(東京)より、抗T11₂ mAb

immunoglobulin; IL-2, interleukin-2; IL-4, interleukin-4; mAb, monoclonal antibody; PBS, phosphate buffered saline; PE, phycoerythrin; PHA, phytohemagglutinin; PPD, purified protein derivative; PWM, pokeweed mitogen; rIL-2, recombinant interleukin-2

(IgG2a) および抗 T11₂ mAb (IgG3) は E. L. Reinherz 博士 (Dana Farber ガンセンター, Boston, MA, U.S.A.) より供与を受けた²⁸⁾²⁹⁾。

III. 二重標識免疫蛍光法による解析

T細胞亜分画における CD45RO 抗原の発現をみるため二重標識免疫蛍光法を用いた³⁰⁾。末梢血単核球を200倍希釈 UCHL1 mAb と 4°C, 30分間反応させた後, 1%非働化ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS, Flow Laboratories, North Ryde, Australia) 加リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) にて2回洗浄し, 200倍希釈ビオチン標識ウサギ抗マウス IgG2a 抗体 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, U.S.A.) と反応させた。同様に2回洗浄後, PE 標識ストレプトアビジン (streptoavidin) (Becton Dickinson) で蛍光染色し, T細胞亜分画の同定のために FITC 標識抗 CD4 mAb または抗 CD8 mAb を添加した。CD4 細胞における CD45RA 抗原発現の解析に対しては PE 標識抗 CD45RA mAb と FITC 標識抗 CD4 mAb を同時に加えた。二重標識免疫蛍光法の解析には EPICS C フローサイトメーター (Coulter Electronics Inc., Hialeah, FL, U.S.A.) を用いた。

IV. CD4 細胞分画およびB細胞の分離

CD4 細胞亜群は EPICS C フローサイトメーターを用いたセル・ソーティング法 (cell sorting 法) にて分画した。成人 E⁺ 細胞を上述のごとく抗 CD45RO mAb と抗 CD4 mAb にて免疫蛍光染色し, CD4 細胞を CD45RO 陽性 (CD45RO⁺) および CD45RO 陰性 (CD45RO⁻) の二つの細胞分画に分離した。CD45RO⁺ 細胞を分離するときには蛍光強度の強い細胞のみを選び, 弱陽性の細胞は除外した。一部の実験ではメモリーT細胞またはナイーブT細胞を得るため CD45RA (2H4)⁻ 細胞または CD45RO (UCHL1)⁻ 細胞をセル・ソーティング法にて単離した。新生児 (臍帯血) E⁺ 細胞は FITC 標識抗 CD4 mAb のみで染色し, 新生児未分画 CD4 細胞を同様に分離した。分離した各 CD4 細胞分画は98%以上 CD3 抗原陽性であり, CD14⁺ 単球や CD20⁺ B細胞は0.1%以下であった。各 CD4 細胞分画のヘルパー活性を評価する実験のために, 成人 E⁻ 細胞を抗 CD20 mAb にて染色し, 同様にセル・ソーティング法にて CD20⁺ 細胞を分離し, 成人B細胞を得た。

V. 各 CD4 細胞分画の増殖反応性

各 CD4 細胞分画は10%非働化ヒト血清, 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol, 5×10^{-5} M), L-グルタミン (0.3mg/ml), ペニシリン (200U/ml), ゲンタマイシン (10 μ g/ml), Hepes 緩衝液 (25mM,

Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.) を含む RPMI 1640 培養液 (Gibco) にて浮遊し, 96穴平底マイクロタイタープレート (Corning Glass Works, Corning, NY, U.S.A.) の1穴あたり 5×10^4 個の細胞を分注して培養した。マイトジェンや抗原刺激のときには1穴あたり同一検体より得た放射線照射した 5×10^3 個の単球を添加した。PHA (0.1% vol/vol; Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.), コンカナバリン A (concanavalin A, Con A, 10 μ g/ml; Difco Laboratories), ポークウィード マイトジェン (pokeweed mitogen, PWM, 500倍希釈; Gibco), 精製ツベルクリン (purified protein derivative, PPD, 10 μ g/ml; 日本 BCG 株式会社, 東京) を用い各 CD4 細胞分画を刺激した。PHA および Con A 刺激は3日間, PWM および PPD 刺激の場合は5日間培養した。抗 CD2 mAb の刺激は抗 T11₂ mAb と抗 T11₂ mAb の組合せを最終的に2000倍希釈で用い単球の存在下あるいは非存在下で3日間した。抗 CD3 mAb に対する反応性は, 単球の存在下では培養液中に 10ng/ml の濃度になるように添加するか, あるいは単球の非存在下で mAb をマイクロタイタープレート1穴あたり 200ng 固相化³¹⁾し, どちらの条件でも5日間培養した。培養後の CD4 細胞の抗 CD2 mAb や抗 CD3 mAb に対する反応性を検討した一部の実験では種々の濃度の抗 CD2 mAb を可溶性の状態では, 抗 CD3 mAb は固相化した状態で用いた。全ての培養は37°C, 5%炭酸ガス培養器内で行ない培養停止12時間前に ³H 標識チミジン (tritiated thymidine, ³H-TdR, New England Nuclear, Boston, MA, U.S.A.) を1穴あたり 0.2 μ Ci 添加し, ³H-TdR の取り込みを液体シンチレーションカウンターにて測定した。

VI. PWM 刺激系におけるB細胞に対するヘルパー活性

B細胞の Ig 産生に対する CD4 細胞のヘルパー活性を成人 CD20⁺ B細胞を用いた PWM 刺激の培養系で検討した。96穴平底マイクロタイタープレートの1穴あたり 3×10^4 個の成人 CD20⁺ B細胞と 1×10^5 個の各 CD4 細胞亜群を分注し, 1×10^4 個の単球と200倍希釈の PWM の存在下で培養した。培養7日後の培養上清中の Ig 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定し³²⁾, ヘルパー活性とした。ELISA 用96穴平底マイクロタイタープレート (Flow Laboratories, Mclean, VA, U.S.A.) を0.02%アジ化ナトリウム含有 pH 9.6, 0.05M 炭酸緩衝液にて希釈したヤギ抗ヒト IgG, IgM または IgA 抗体 (Tago Inc., Burlingame, CA, U.S.A.) で 4°C, 18時間コー

ティングした。0.05% Tween-20 (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, U.S.A.) および0.02%アジ化ナトリウム含有 PBS (PBS-Tween) にて洗浄した後、1% FCS 加 PBS-Tween 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-Tween で洗浄後、PBS-Tween 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, Inc.) を加え、室温で2時間反応させた。その後、PBS-Tween で洗浄し、最後に pH 9.8 のジエタノールアミン緩衝液で1 mg/ml に調整した p-ニトロフェニル リン酸 (p-nitrophenyl phosphate, Sigma Chemical Co.) を添加し、呈色反応を吸光度計 EAR 400 (Slit-lab instruments, Austria) により波長 405nm にて測定し、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。

VII. サプレッサー活性

Miyawaki ら²⁾の方法を一部改変し、新生児 CD4 細胞と成人ナイーブ CD4 細胞の PWM 刺激系における B 細胞の Ig 産生に対するサプレッサー活性を求めた。成人より分離した 3×10^4 個の CD20⁺ B 細胞、ヘルパー T 細胞としての 1×10^5 個の CD45RO⁺ CD4 細胞及び 1×10^4 個の単球に対し CD4 細胞の各分画を 1×10^5 個加え、PWM 存在下で7日間培養した。培養

上清中の Ig 濃度は上述のごとく ELISA にて測定した。

VIII. CD4 細胞分画の培養と維持

10% FCS 加 RPMI 1640 培養液で 3×10^5 個/ml の濃度に調整した CD4 細胞と放射線照射した単球を 0.1% vol/vol PHA の存在下で培養した。培養4日後、細胞を洗浄し、リコンビナントインターロイキン-2 (recombinant IL-2, rIL-2, 塩野義製薬株式会社, 大阪) を 50U/ml の濃度で添加した10% FCS 加 RPMI 1640 培養液で 2×10^5 個/ml に調整し、再び培養した。培養 CD4 細胞は2~3日毎に 50U/ml の rIL-2 を含む培養液で 2×10^5 個/ml に調整し、維持した。ヘルパー活性や抗 CD2 mAb, 抗 CD3 mAb に対する反応性を検討する際には、培養細胞を FITC 標識抗 CD4 mAb および $20 \mu\text{g/ml}$ のプロピディウム イオダイド (propidium iodide) にて染色し、EPICS C フローサイトメーターにて死細胞を除き CD4 抗原陽性の生細胞を選択単離した³⁹⁾。

成 績

- I. T 細胞サブセットにおける CD45RO 抗原発現の加齢に伴う増加
異なる年齢における T 細胞サブセットでの CD45

Table 1. Increase in expression of CD45RO antigen on peripheral blood T cell subpopulations with child growth^a

Age	(n)	%CD45RO Expression on	
		CD4Cells	CD8Cells
Newborn	(11)	3.1±0.8 ^b	2.9±1.0
0-1 Month	(5)	8.7±1.5	4.1±1.1
2-3 Months	(10)	10.7±1.0	8.3±1.4
4-11 Months	(13)	11.1±1.2	12.7±1.7
1-2 Years	(12)	16.7±1.7	15.7±1.9
3-6 Years	(14)	21.9±1.2	14.9±1.5
7-12 Years	(16)	28.7±2.3	18.6±2.3
13-17 Years	(8)	36.2±3.1	24.1±2.8
Adult	(20)	38.6±4.2	28.6±2.4

^aPBMC from various ages were stained for CD45RO using UCHL1 mAb, biotin-conjugated rabbit anti-mouse IgG2a and PE-conjugated streptavidin and counterstained for CD4 or CD8 with FITC-conjugated anti-Leu3a mAb or anti-Leu2a mAb. The percentages of CD45RO-positive cells in CD4 or CD8 subpopulation were evaluated by the two-color immunofluorescence method using Epics-C flow cytometer.

^bMean±SEM.

RO 抗原発現を 2 重標識免疫蛍光法にて解析し、CD45RO 抗原陽性 CD4 及び CD8 細胞の比率を求めた (表 1)。成人末梢血では CD45RO 陽性細胞の比率は CD4 細胞で平均 38.6%、CD8 細胞で 28.6%であった。これに対し新生児臍帯血ではどちらの T 細胞サブセットにおいても 3% 以下のほんの僅かな細胞が CD45RO 陽性であった。CD45RO 陽性 T 細胞の比率は年齢の上昇とともに増加し、13 歳を越えると成人レベルに到達した。

II. 新生児 CD4 細胞の表面形質

二重標識免疫蛍光法にて解析すると、成人 CD4 細胞における CD45RO 及び CD45RA 抗原の発現は 2 相性のパターンを示した (図 1)。分子量の異なる CD45

アイソフォームである CD45RO と CD45RA 抗原の成人 CD4 細胞における発現は互いに相補的であるとされる。成人 E⁺ 細胞から CD45RA (2H4) 陽性細胞または CD45RO (UCHL1) 陽性細胞をフローサイトメーターにて除き、CD4 細胞における CD45RA、CD45RO 抗原発現を解析した。図 1 に示すように 2H4 (CD45RA) 陰性 CD4 細胞は全て CD45RO 抗原を発現し、一方、UCHL1 (CD45RO) 陰性 CD4 細胞は CD45RA 抗原陽性であった。新生児 CD4 細胞の大部分は CD45RA 陽性、CD45RO 陰性であり成人ナイーブ CD4 細胞と同様の表面形質を有していた。

III. マイトジェン及び PPD に対する反応性

新生児 CD4 細胞の各種マイトジェン及び PPD に

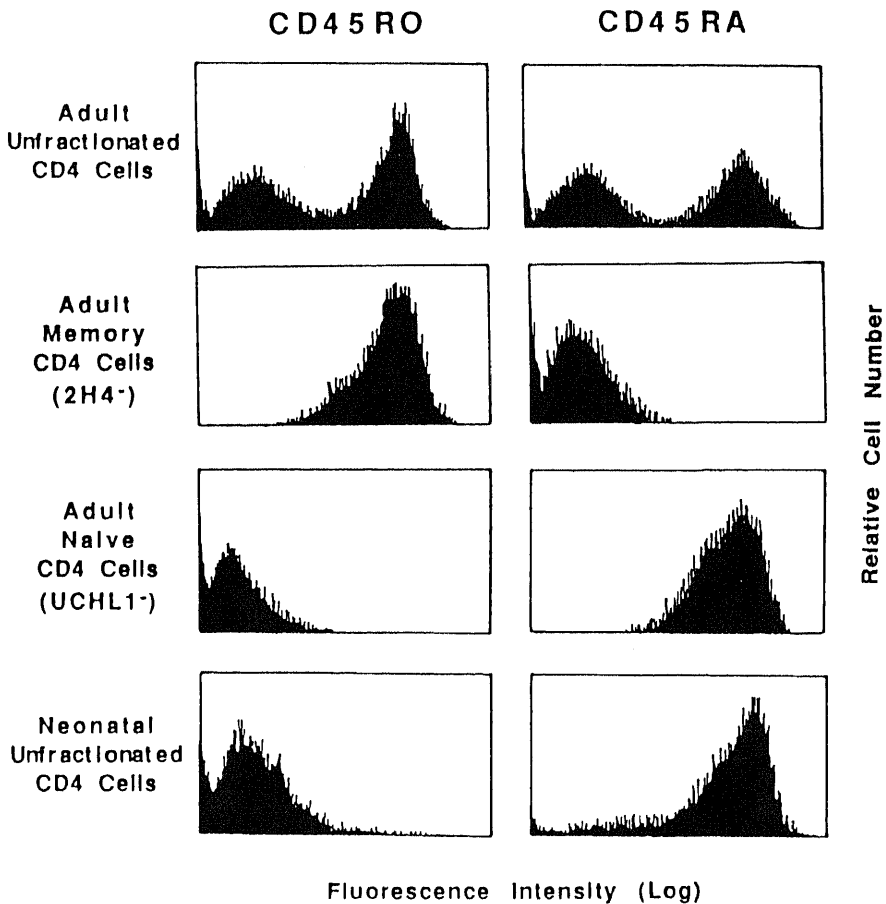


Fig. 1. Immunofluorescence analysis of adult CD4 cell subpopulations (memory and naive) and neonatal CD4 cells. The memory and naive populations of adult CD4 cells were obtained by depletion of 2H4 (CD45RA)⁺ and UCHL1 (CD45RO)⁺ cells using Epics-C flow cytometer. Expression of CD45RO and CD45RA on each cell population was determined by two-color immunofluorescence method.

対する反応性を成人 CD4 細胞のメモリー (CD45RO⁺) 細胞分画, ナイーブ (CD45RO⁻) 細胞分画と比較検討した (表 2). PHA 及び Con A に対する増殖反応は新生児 CD4 細胞と成人ナイーブ CD4 細胞でやや増強していたが, PWM に対する反応性は新生児 CD4 細胞と二つの成人 CD4 細胞分画ではほぼ同様であった. しかし, 成人メモリー CD4 細胞では PPD に対し明らかな増殖反応が認められたが, 成人ナイーブ CD4 細胞は全く反応しなかった. 新生児 CD4 細胞はこの抗原に暴露されておらず予想されたとおり増殖反応は認められなかった.

IV. 抗 CD3 mAb 及び抗 CD2 mAb で誘導される増殖反応

CD3 及び CD2 分子はヒト成熟 T 細胞に発現され,

T 細胞は抗 CD3 及び抗 CD2 mAb により活性化を受け, 増殖シリンホカインを産生することが知られている³⁴⁾. CD3 及び CD2 分子を介した活性化につき新生児 CD4 細胞と 2 つの成人 CD4 細胞分画について検討した.

表 3 に示すように単球の存在下で可溶性抗 CD3 mAb に対しては成人メモリー CD4 細胞は強い増殖反応性を示したが, 新生児 CD4 細胞と成人ナイーブ CD4 細胞では反応性はわずかに認められるにすぎなかった. 抗 CD3 mAb をプラスチック表面やセファロース粒子に固相化することにより単球の非存在下においても T 細胞が増殖することが知られている^{31,35)}. 抗原を介した活性化において新生児単球の機能低下が関与している可能性も考えられたため, 固相法により

Table 2. Proliferative responses of adult and neonatal CD4 subpopulations to mitogens and PPD

Incubation Time	Stimuli	Adult CD4 Cells		Neonatal CD4 Cells
		CD45RO ⁺	CD45RO ⁻	
3 Days	None	302±109	116±32	132±83
	PHA	41,000±2,016	72,150±2,788	74,470±4,520
	Con A	27,650±2,525	33,919±3,695	45,870±7,423
5 Days	None	120±54	77±61	336±26
	PWM	54,021±3,117	59,828±6,250	65,028±7,096
	PPD	25,737±2,556	445±170	1,234±446

Each CD4 subpopulation (5×10^4 /well) isolated by the sorting technique was cultured in the presence of irradiated autologous monocytes (5×10^5 /well) with PHA (0.1% vol/vol), Con A ($10 \mu\text{g/ml}$), PWM (1/500 dilution), or PPD ($10 \mu\text{g/ml}$). The cells were pulsed with $0.2 \mu\text{Ci}$ of [³H] TdR per well 12 hr before harvesting. The radioactivity was measured in a liquid scintillation counter. The data are expressed as the mean cpm (\pm SEM) of five different donors.

Table 3. Proliferative responsiveness of adult and neonatal CD4 subpopulations to anti-CD3 mAb

Anti-CD3	Adult CD4 Cells		Neonatal CD4 Cells
	CD45RO ⁺	CD45RO ⁻	
None	156±45	123±57	243±24
Soluble	37,621±8,262	2,308±1,150	3,859±1,024
Immobilized	46,403±5,088	2,036±1,149	1,043±218

The cells (5×10^4) were cultured in the presence of soluble OKT3 (10 ng/ml) together with irradiated monocytes or stimulated with immobilized OKT3 (200 ng/well). [³H] TdR incorporation was determined after 5 days in culture. The data are expressed as the mean cpm (\pm SEM) of five different donors.

新生児 CD4 細胞の抗 CD3 mAb に対する反応性を検討した。固相化した抗 CD3 mAb に対しても新生児 CD4 細胞は全く反応せず、成人ナイーブ CD4 細胞でも同様であった。

表 4 は各 CD4 細胞分画における抗 CD2 mAb 誘導性の増殖反応の結果を示す。CD2 分子を介した T 細胞の活性化は単球の非存在下でも認められる²⁰⁾とされるが、単球の非存在下で抗 T11₂ mAb と抗 T11₃ mAb に対し成人メモリー (CD45RO⁺) CD4 細胞は強く反応した。しかし新生児 CD4 細胞も成人ナイーブ CD4 細胞も全く反応しなかった。興味深いことに抗 CD2 mAb に対するこの二つの細胞分画の低反応性は単球の添加により完全に回復した。

V. B 細胞の Ig 産生に対するヘルパー活性及びサプレッサー活性

新生児 CD4 細胞と成人 CD4 細胞亜群の B 細胞分化

に対するヘルパー活性を、各々の CD4 細胞分画を成人 B 細胞に加えた PWM 刺激培養系の Ig 産生で検討した。表 5 に示すように成人メモリー CD4 細胞を添加すると PWM で誘導される B 細胞の Ig 産生は全ての Ig 分画において認められるが、成人ナイーブ CD4 細胞では Ig 産生は不十分である。成人ナイーブ CD4 細胞と B 細胞を混合培養した場合は低いながらも顕著に Ig 産生が認められるのに対し、新生児 CD4 細胞は全く Ig 産生に対するヘルパー活性を示さなかった。

新生児 T 細胞は B 細胞分化に対し強いサプレッサー活性を有することが多数報告され^{21,22)}、この強いサプレッサー活性は CD4 細胞が主に担っていることも示されている⁹⁾。新生児 CD4 細胞と成人ナイーブ CD4 細胞についてサプレッサー活性を比較検討したところ (表 6)、新生児 CD4 細胞は PWM 刺激下における B

Table 4. Anti-CD2-induced proliferation of adult and neonatal CD4 subpopulations in the absence or presence of monocytes

Stimuli	Monocytes	Adult CD4 Cells		Neonatal CD4 Cells
		CD45RO ⁺	CD45RO ⁻	
None	-	164±32	450±35	678±88
Anti-CD2	-	57,206±3,906	710±306	1,081±249
None	+	456±56	302±68	314±90
Anti-CD2	+	64,200±8,544	62,206±7,567	80,430±4,466

The cells (5×10⁴) were cultured with a combination of anti-Y11₂ and anti-T11₃ (1/2000 dilution) mAb in the absence or presence of monocytes. [³H] TdR incorporation was determined after 3 days of culture. The data are expressed as the mean cpm (± SEM) of five different donors.

Table 5. Helper functions of adult and neonatal CD4 subpopulations for PWM-induced production of Ig by B cells^a

Cell Populations	Ig Levels (ng/ml)		
	IgM	IgG	IgA
None	177±24 ^b	93±32	115±38
Adult CD45RO ⁺ CD4	6,704±901	4,878±743	2,302±395
Adult CD45RO ⁻ CD4	1,219±94	789±196	426±53
Neonatal CD4	103±19	131±16	168±14

^aIsolated CD4 subpopulations (1×10⁵/well) were added to the mixtures of allogenic adult CD20⁺B cells (3×10⁴/well) and irradiated monocytes (1×10⁴/well) and cultured with PWM for 7 days. The concentrations of IgM, IgG or IgA in cultured supernatants were measured by ELISA assay.

^bThe results represent the mean (± SEM) of triplicate cultures from one of four separate experiments.

細胞の Ig 産生を顕著に抑制したが、成人ナイーブ CD4 細胞は新生児 CD4 細胞と比較し弱いサプレッサー活性を示すのみであった。

VI. 活性化に伴う新生児 CD4 細胞の表面形質の変化

ナイーブ T 細胞を試験管内でマイトジェンにて刺激すると CD45RA 抗原の発現は消失し、CD45RO 抗原を発現する様なる事から、生体内においても種々の抗原刺激に伴いナイーブ T 細胞がメモリー T 細胞に転換していくと推測されている¹⁰。新生児 CD4 細胞も試験

Table 6. Suppressor activity of adult CD45RO⁻ and neonatal CD4 cells on PWM-induced Ig production of B cells^a

Added Cells	Ig Levels (ng/ml)		
	IgM	IgG	IgA
None	7,234 ±458 ^b	4,850 ±143	2,455 ±190
Adult CD45RO ⁻ CD4	5,715(18.7) ^c ±476	3,687(24.0) ±170	1,847(24.8) ±192
Neonatal CD4	1,601(76.9) ±261	1,012(79.7) ±78	692(71.8) ±62

^aSuppressor activity for Ig-production by B cells was assessed by adding each CD4 cell population (1×10^6 /well) to the cultures containing CD20⁺B cells (3×10^6 /well), CD45RO⁺CD4 cells (1×10^6 /well) and irradiated monocytes (1×10^6 /well) from an unrelated adult donor. The cells were cultured with PWM for 7 days and the production of IgM, IgG or IgA was determined. The suppression was determined by comparing with the control cultures without added CD4 cells. The results were obtained from one of three separate experiments.

^bMean \pm SEM of triplicate cultures.

^cPercent of suppression.

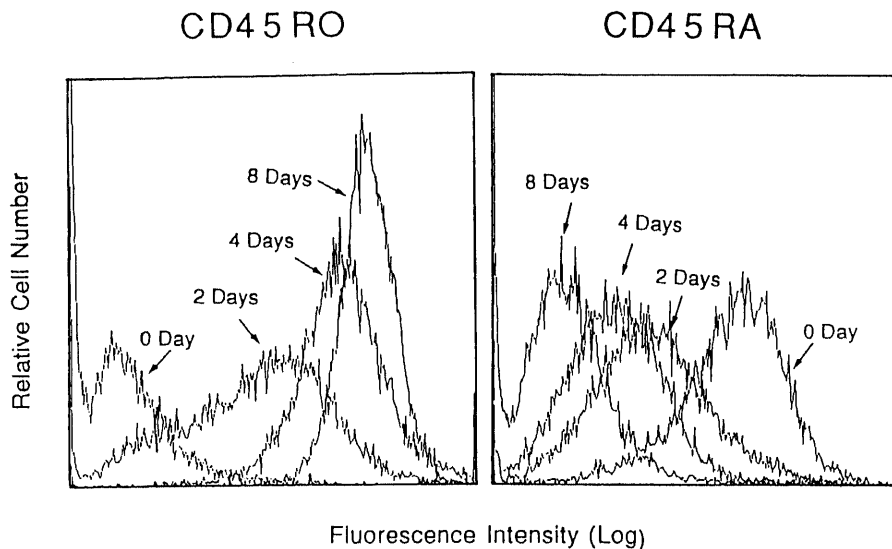


Fig. 2. The change in expression of CD45RO and CD45RA on neonatal CD4 cells after culture with PHA and IL-2. Purified neonatal CD4 cells were stimulated with PHA (0.1% vol/vol) and maintained in the presence of rIL-2 (50 U/ml). Cultured neonatal CD4 cells were stained for CD45RO and CD45RA by two-color immunofluorescence and analyzed on Epcics-C flow cytometer.

管内にて刺激することによりメモリーT細胞の表面形質に変化すると推測され、PHAで刺激しIL-2存在下で培養した場合の新生児CD4細胞のCD45RO、CD45RA抗原発現への影響を解析した。図1にてもすでに示したように培養前の新生児CD4細胞はほとんどCD45RO⁻、CD45RA⁺であった。新生児CD4細胞

をPHAで刺激するとCD45RO抗原の速やかな発現が認められ、培養4日目には大多数の細胞がCD45RO抗原を発現した(図2)。一方、CD45RA抗原は培養日数が進むに従い徐々にその発現強度を減じ、培養8日目には全て消失した。新生児CD4細胞のなかに3%以下と少ないながら存在するCD45RO⁺

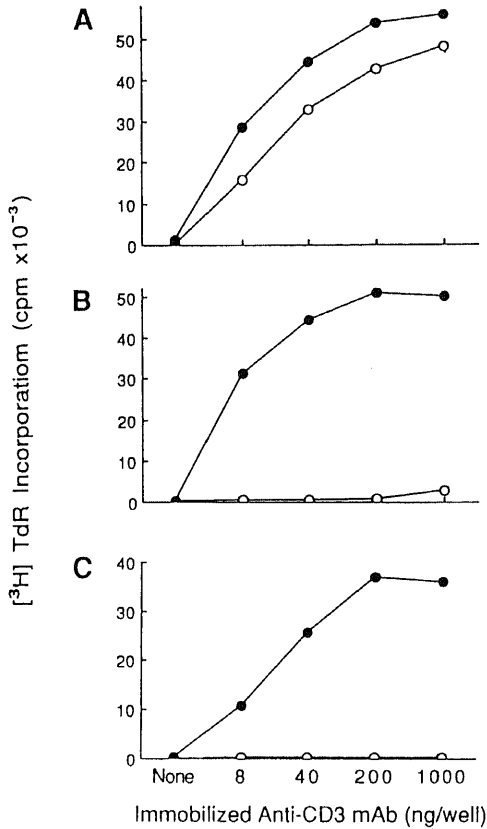


Fig. 3. Proliferative responses of freshly isolated and cultured CD4 cell subpopulations to immobilized anti-CD3 mAb. Adult CD4 subsets, CD45RO⁺ (A) or CD45RO⁻ (B), and neonatal CD4 cells (C) were isolated by EPICS C flow-cytometer and stimulated with PHA (0.1% vol/vol) and maintained with rIL-2 (50 U/ml) for 10 days. Freshly isolated (○—○) or cultured (●—●) CD4 cells were cultured for 5 days on the microtiter plates immobilized to various concentration of anti-CD3 mAb (OKT3). $[^3\text{H}]$ TdR incorporation was measured during the last 12 hr of culture and expressed as the mean cpm of triplicate cultures. The results are from one of three separate experiments with the same outcomes.

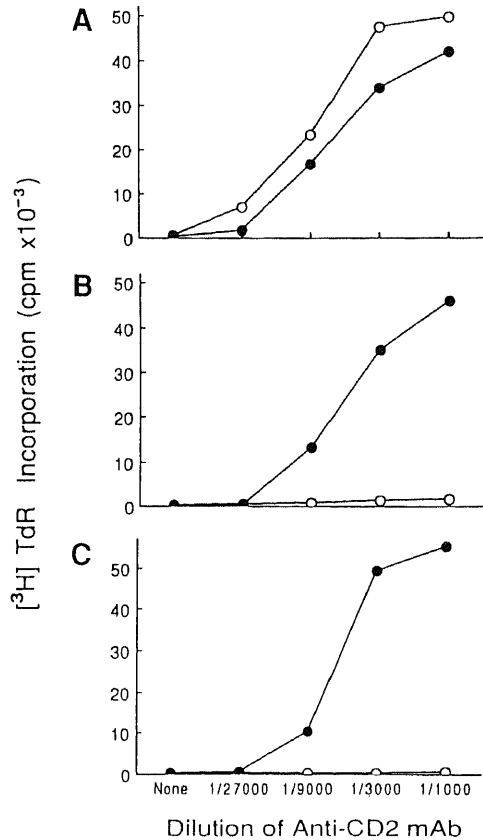


Fig. 4. Proliferative responses of freshly isolated and cultured CD4 cell subpopulations to anti-CD2 mAb. Cultured cells were obtained from adult CD4 subsets, CD45RO⁺ (A) or CD45RO⁻ (B), and neonatal CD4 cells (C) in the same manner as described in the legend of Figure 3. Freshly isolated (○—○) or cultured (●—●) CD4 cells were stimulated for 3 days with various concentration of anti-T11₂ and anti-T11₁ mAbs without monocytes. $[^3\text{H}]$ TdR incorporation was measured during the final 12 hr of culture and expressed as the mean cpm of triplicate cultures. The results are from one of three separate experiments with the same outcomes.

CD4 細胞が選択的に増加した可能性を否定するため、CD45RO⁺ CD4 細胞を除去し同様に培養したが、CD45RO 抗原発現の違いは認められなかった。また、結果は示さないが、成人ナイーブ CD4 細胞を同じ条件にて培養しても同様の CD45 抗原発現変化のパターンが得られた。

VII. 培養新生児 CD4 細胞のメモリー細胞様機能の獲得

ここで新生児 CD4 細胞がナイーブ T 細胞としての表面形質、CD45RA⁺ からメモリー T 細胞としての CD45RO⁺ への細胞表面形質の転換に伴い、成人メモリー CD4 細胞と同様な機能を持つことができるか問題となってくる。PHA で刺激し IL-2 の存在下で10日間培養した後、CD4 陽性の生細胞をセル・ソーティング法にて分離し機能的解析に用いた。上述したように培養前の二つの成人 CD4 細胞分画では CD3 や CD2 レセプターを介した活性化に顕らかな違いを認めたため、培養後の新生児 CD4 細胞の抗 CD3 mAb

と抗 CD2 mAb に対する反応性を単球の非存在下、つまり抗 CD3 mAb は固相化した条件で、抗 CD2 mAb は可溶性の条件を用い検討した。培養前の新生児 CD4 細胞は種々の濃度の抗 CD3 mAb と抗 CD2 mAb に対しても増殖反応を示さなかったが、培養後の新生児 CD4 細胞は抗 CD3 mAb 及び抗 CD2 mAb に対し用量依存性の増殖反応が認められた(図3, 図4)。培養後の成人ナイーブ CD4 細胞の抗 CD3 mAb 及び抗 CD2 mAb に対する反応性も同様な結果であった。培養後の成人メモリー CD4 細胞の抗 CD3 mAb 及び抗 CD2 mAb に対する増殖反応は培養前とほぼ同程度であった。

培養した各 CD4 細胞分画を成人 B 細胞に添加、上述したと同様に PWM 刺激下で培養し、上清中の Ig 産生量を B 細胞の Ig 産生に対する培養後の CD4 細胞各分画のヘルパー活性とし、培養前のヘルパー活性と比較した(図5)。先に述べたように培養前の新生児 CD4 細胞のヘルパー活性は完全に欠如していたが、培

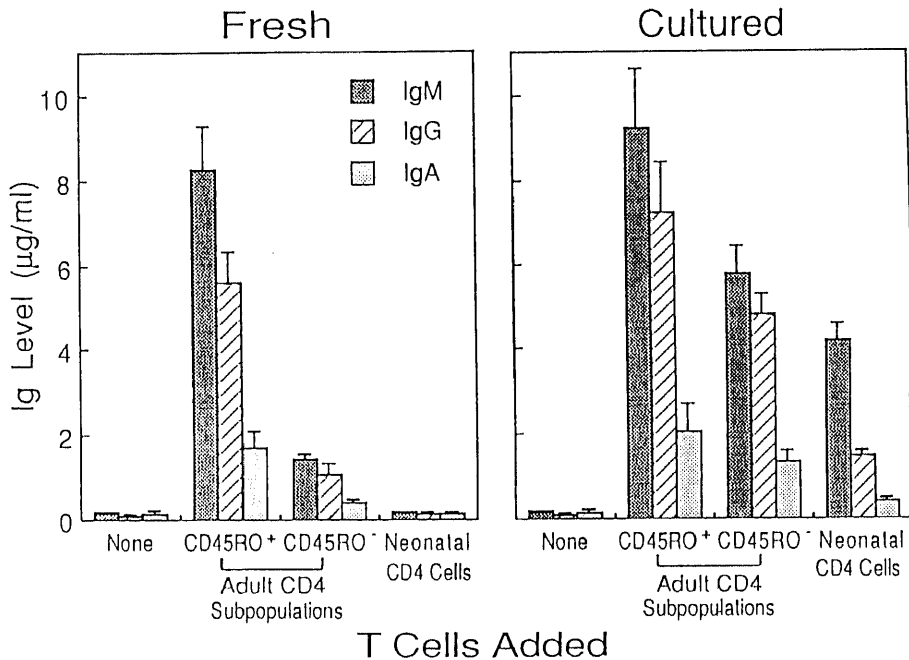


Fig.5. Helper functions of freshly isolated and cultured CD4 cell subpopulations for Ig-production of B cells. Cultured CD4 cell subpopulations were prepared by stimulation of purified CD4 cells with PHA and IL-2 for 10 days. Each CD4 population was added to the cell mixtures of adult CD20⁺ B cells and irradiated monocytes and cultured for 7 days in the presence of PWM. The concentrations of IgM (■), IgG (▨) or IgA (□) in culture supernatants were determined by ELISA. Data were expressed as the means (± SEM) of three separate experiments.

養した新生児 CD4 細胞を成人 B 細胞に添加することにより全ての Ig 分画の顕らかな産生が認められた。Clement ら³⁰⁾の報告にもあるように分離された直後の CD4 細胞のヘルパー活性は主に CD45RO⁺ 分画に認められるが、PHA で刺激し IL-2 にて培養された CD45RO⁻ CD4 細胞も PWM 刺激下でヘルパー活性を有する様になる。今回の実験においても培養により CD45RO の表面形質を獲得した成人ナイーブ CD4 細胞は全ての Ig 分画の産生誘導に対し培養前メモリー CD4 細胞と同程度効果的であった。培養後の成人ナイーブ CD4 細胞のヘルパー活性と比較すると、培養後の新生児 CD4 細胞のヘルパー活性は弱く、IgM はある程度産生されるが IgA 産生に関してはかなり低かった。

考 察

新生児は抗原刺激をほとんど受けていないという事実からも推測されたが、新生児 T 細胞のほとんど全てが CD45RO⁻、CD45RA⁺、すなわち、ナイーブ T 細胞の表面形質を呈していることが二重標識蛍光免疫法による解析で明白となった。抗原暴露の増加に伴い、CD45RO を発現している CD4、CD8 細胞の比率は年齢が進むに従い増加し、13歳以上ではほぼ成人レベルに達した。Hayward ら³⁷⁾や Pirruccello ら³⁸⁾も T 細胞における CD45RO 発現の年齢に伴う増加を報告している。新生児 T 細胞は 3% 以下とごくわずかであるが顕やかに CD45RO 抗原を発現している。正常な新生児臍帯血におけるごく少数ながら存在する CD45RO⁺ T 細胞が母親の細胞や細菌の産生物質などの胎盤を通しての何らかの抗原刺激により生じたものかどうかは現在のところ推測の域を越えず、その意義については不明である。

成人 T 細胞と比較し、顕やかに異なる機能的特徴を新生児 T 細胞が有することは多数報告されている²⁹⁻¹⁰⁾。渉猟したかぎりナイーブ細胞、メモリー細胞といった概念から新生児 T 細胞と成人 T 細胞とを比較した研究は見当たらない。本研究では新生児 CD4 細胞の幾つかの機能につき成人のナイーブ CD4 細胞、メモリー CD4 細胞と比較検討した。新生児 CD4 細胞と二つの成人 CD4 細胞分画はマイトジェンに対しほぼ等しく反応した。PHA や Con A に対する増殖反応は成人ナイーブ CD4 細胞と新生児 CD4 細胞でやや増強しており、ナイーブ T 細胞の PHA に対する反応性の増強は他の報告でも示されている¹⁵⁾¹⁷⁻¹⁹⁾。抗原刺激で誘導される細胞増殖については、リコール抗原のひとつである PPD に対してツベルクリン反応陽性の成人

供血者から得たメモリー CD4 細胞にのみみられ、成人ナイーブ CD4 細胞は全く反応が認められなかった。この抗原に暴露されていない新生児の CD4 細胞では増殖反応が認められないのは当然のことと考えられる。

メモリー CD4 細胞は PWM 刺激系において B 細胞の分化を特異的に誘導すると報告される¹⁷⁾¹⁹⁾。今回の研究でも成人メモリー CD4 細胞は PWM 刺激による B 細胞の Ig 産生を強く誘導したが、成人ナイーブ CD4 細胞添加による Ig 産生は不十分であった。新生児 CD4 細胞と成人 B 細胞とを PWM で刺激培養した場合では T 細胞分画を添加しない場合と同様のわずかな Ig 産生しか認められなかった。同じナイーブ T 細胞としての表面形質を有している新生児 CD4 細胞と成人ナイーブ CD4 細胞とではヘルパー活性の点では顕やかに異なり、成人ナイーブ CD4 細胞のヘルパー活性は弱いものの Ig 全ての分画において低いが、B 細胞のみを培養した場合と比べ顕やかな産生増加を PWM 刺激下の培養上清中に認めた。PPD や抗 CD3 mAb、抗 CD2 mAb に対する増殖反応などの他の機能的解析の結果が新生児 CD4 細胞と成人ナイーブ CD4 細胞とで変わらないことより、この違いは成人 CD4 細胞を CD45RO⁺、CD45RO⁻ の二つの分画に分離したセル・ソーティング法の不正確さからくるものではなく、むしろ、このヘルパー活性の違いは年齢と関連した機能的素因と考えられる。

新生児 CD4 細胞は B 細胞の分化に対し強いサブプレッサー活性を持つことが指摘されている³⁰⁾。成人のナイーブ CD4 細胞もサブプレッサー・インデューサー細胞として機能し CD8 細胞の Ig 産生抑制能を誘導するとともにそれ自身も B 細胞の分化を抑制する機能を持つと報告される¹⁹⁾。この観点からサブプレッサー活性を新生児 CD4 細胞と成人ナイーブ CD4 細胞とで比較したが、PWM 刺激系での Ig 産生を新生児 CD4 細胞は成人ナイーブ CD4 細胞より強く抑制した。サブプレッサー活性からみても同じ表面形質を持ちながら新生児 CD4 細胞と成人ナイーブ CD4 細胞とでの相違は明らかであった。

成人末梢血 CD4 細胞のメモリー (CD45RO⁺) 分画とナイーブ (CD45RO⁻) 分画ではリコール抗原に対する反応性や Ig 産生に対するヘルパー活性の違い¹³⁾¹⁵⁾¹⁷⁻²²⁾に加え、いくつかの機能的な相違が報告されている。これらのうち CD3 や CD2 レセプターを介しての活性化において、この二つの細胞分画間に顕やかな相違点が指摘されている¹⁹⁾²²⁾。CD3 分子に結合する mAb を介する増殖反応はナイーブ T 細胞よりメモリー T 細胞

の方が増強しているとされる¹⁹⁾²⁰⁾。今回の研究でも、抗 CD3 mAb (OKT3 mAb) に対し成人メモリー CD4 細胞は強い反応性を示し、新生児 CD4 細胞と成人ナイーブ CD4 細胞の反応性はほとんど認められなかった。Papadogiannakis ら²⁰⁾も抗 CD3 mAb に対する新生児リンパ球の増殖反応の低下を報告している。単球の存在なしで増殖反応が認められる固相化した抗 CD3 mAb の対しても、新生児 CD4 細胞の反応性が低下していることから新生児 CD4 細胞の CD3 抗原を介した活性化の低下の原因が新生児単球の機能の異常による可能性は少ないと考えられる。固相化した抗 CD3 mAb に対する新生児 CD4 細胞の活性化の低下は、抗 CD3 mAb の細胞表面の T 細胞レセプターへの接触に続く細胞内での生化学的変化の欠如に由来するのかもしれない。単球の存在下での予備的な用量依存性実験においても 50ng/ml の高濃度の抗 CD3 mAb に対し、新生児 CD4 細胞は僅かな増殖反応しか示さなかった。Sanders ら¹⁹⁾もメモリー T 細胞はナイーブ T 細胞より、より低い濃度の抗 CD3 mAb に対して反応し増殖すると指摘し、また Byrne ら²⁰⁾はナイーブ T 細胞の抗 CD3 mAb に対する低反応性が IL-2 の添加により増強を受け増殖反応の改善が認められと報告している。

単球の非存在下においても成人メモリー CD4 細胞は二つの抗 CD2 mAb すなわち抗 T11₂ mAb と抗 T11₃ mAb の組み合わせに強く反応したが、新生児 CD4 細胞と成人ナイーブ CD4 細胞の抗 CD2 mAb で誘導される増殖反応は今回使用した抗体の濃度ではほとんど見られなかった。興味深いことにこの新生児 CD4 細胞と成人ナイーブ CD4 細胞の抗 CD2 mAb で誘導される増殖反応の低下が、単球の添加により成人メモリー CD4 細胞と同程度まで反応性が増強されたことである。予備的実験において新生児 CD4 細胞の抗 CD2 mAb に対する低反応性は IL-2 の添加により回復した。これらの結果は新生児 CD4 細胞においても単球の産生する因子や IL-2 により CD2 レセプターを介した活性化が充分起きること示唆している。メモリー T 細胞とナイーブ T 細胞の CD2 抗原を介した反応性の違いに関して異なる報告が見られ、Sanders ら¹⁹⁾や Byrne ら²⁰⁾は今回の結果と同様メモリー T 細胞の方に抗 CD2 mAb に対する反応性が強く認められと報告しているのに対し、Matsuyama ら²⁰⁾は逆にナイーブ (CD45RA⁺) T 細胞がメモリー (CD45RA⁻) 細胞より抗 CD2 mAb に対し強く反応すると述べている。この結果の違いは今回使用したセル・ソーティング法と Matsuyama らが用いたパンニング (panning)

法といった細胞分画の分離方法の違いに起因するところが大きいと考えられる。細胞分画の互いへの混入は実験結果にかなりの影響を与えると考えられ、予備的実験ではナイーブ CD4 細胞に対し 10% 以下のメモリー CD4 細胞を添加することで抗 CD2 mAb に対する反応性は顕著に増強された。Gerli ら⁴⁰⁾は単球を完全に除去した新生児 T 細胞は抗 CD2 mAb の刺激に反応しないと述べており、本研究における結果と一致する。

生体内において外来抗原に暴露され刺激を受け、メモリー T 細胞プールが形成されていくのに類似し、試験管内において成人ナイーブ T 細胞が PHA の刺激により CD45RO⁺ に、つまりメモリー T 細胞としての表面形質に転換すること、しかし逆方向への表面形質の転換は認められ¹⁹⁾²⁰⁾ことが示されている。今回、PHA と IL-2 の存在下の培養により新生児 CD4 細胞の表面形質が CD45RO⁻, CD45RA⁺ から CD45RO⁺, CD45RA⁻ へ転換することを示したが、培養された新生児 CD4 細胞がこの表面形質の転換に伴い成人メモリー (CD45RO⁺) CD4 細胞と同様の機能性を持つようになるかが疑問であった。単球非存在下の条件で可溶性抗 CD2 mAb あるいは固相化した抗 CD3 mAb に対する新生児 CD4 細胞の増殖反応は培養前には認められなかったが、培養後では顕著な反応性の増強が認められるようになった。さらに興味深いことに培養後の新生児 CD4 細胞は成人 B 細胞の PWM 刺激系にての Ig 産生へのヘルパー活性を保有するようになった。同様に培養された成人ナイーブ CD4 細胞も PWM 刺激による Ig 産生を効果的に誘導したが、同じメモリー細胞としての表面形質に転換した培養後の新生児 CD4 細胞と同じ培養後の成人ナイーブ CD4 細胞との間ではヘルパー活性の程度に顕著な相違が認められた。CD45RO 陽性となった培養後の成人ナイーブ CD4 細胞の Ig 産生に対するヘルパー活性はほぼ成人メモリー CD4 細胞のヘルパー活性と遜色なかったが、培養後の新生児 CD4 細胞のヘルパー活性は、特に IgA の産生の面で成人メモリー CD4 細胞と比較して低かった。この理由は現在のところ不明ではあるが、新生児 T 細胞のマイトジェン刺激による IFN- γ や IL-4 といったサイトカイン産生能が欠如しているとされ⁴¹⁾⁴²⁾、新生児 CD4 細胞は B 細胞の分化に対し補助的に働く今のところ限定できない液性因子の産生機能を、培養によりメモリー T 細胞としての表面形質に転換した後においても、欠如している可能性も残されていると考えられる。

新生児 CD4 細胞は成人ナイーブ CD4 細胞と

CD45 抗原のアイソフォームの発現で見ると同じ表面形質を示したが、成人ナীব CD4 細胞と異なるいくつかの機能的特徴を有していた。このことは新生児期における免疫防御機構の不全状態に特別な役割を演じていると推測される。T細胞を介した免疫系の発達・成熟の過程を一層明らかにするために、機能的側面からの新生児T細胞と成人ナীবT細胞の比較検討がさらに必要であると思われる。

結 論

CD45 抗原の観点から新生児 CD4 細胞の表面形質およびT細胞を介した免疫反応系における機能的特異性を成人メモリー CD4 細胞ならびに成人ナীব CD4 細胞と比較検討し、さらに刺激活性化による CD45 アイソフォーム表面形質の転換と機能的変化につき解析を加え、以下の結果を得た。

1. 新生児 CD4 細胞は成人ナীব CD4 細胞と同様、CD45RO⁻, CD45RA⁺ という表面形質を示した。

2. 成人メモリー CD4 細胞とナীব CD4 細胞では PHA, Con A, PWM に対する反応性はほぼ同様であったが、PPD に対してはメモリー CD4 細胞のみが反応した。単球の非存在下で抗 CD3 mAb や抗 CD2 mAb で誘導される増殖反応は成人メモリー CD4 細胞に比し成人ナীব CD4 細胞で著しく不良であった。新生児 CD4 細胞はその表面形質に一致してマイトジェンや PPD, 抗 CD3 mAb, 抗 CD2 mAb に対して成人ナীব CD4 細胞と同様の増殖反応性を示した。

3. PWM 刺激下でのB細胞の Ig 産生に対するヘルパー活性は主にメモリー CD4 細胞分画に見られたが、新生児 CD4 細胞は PWM 刺激下でのB細胞の Ig 産生を全く誘導しなかった。新生児 CD4 細胞はサブレッサー活性を保有し、同じ表面形質の成人ナীব CD4 細胞と比較してもその活性は顕著に強かった。

4. 新生児 CD4 細胞は試験管内において PHA と IL-2 存在下で刺激培養すると CD45RO⁺, CD45RA⁻ つまりメモリー細胞としての表面形質に変化し、培養後の新生児 CD4 細胞の抗 CD3 mAb と抗 CD2 mAb で誘導される増殖反応は成人メモリー CD4 細胞と同程度まで増強された。培養後の新生児 CD4 細胞はB細胞の Ig 産生に対するヘルパー活性も獲得したが、その程度は培養後の成人ナীব CD4 細胞と比較しても弱いものであった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、研究の御指導と御校閲を賜りました恩師金沢大学医学部小児科谷口昂教授に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導いただきました宮脇利男講師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の諸兄ならびに教室員の皆様に深謝いたします。

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、上原記念生命科学財団研究助成金によったことを付記する。本論文の一部は、第19回日本免疫学会(札幌, 1989)、第74回アメリカ免疫学会(New Orleans, 1990)において発表した。

文 献

- 1) Gathings, W. E., Kubagawa, H. & Cooper, M. D.: A distinctive pattern of B cell immaturity in perinatal humans. *Immunol. Rev.*, **57**, 107-126 (1981).
- 2) Miyawaki, T., Seki, H., Kubo, M. & Taniguchi, N.: Suppressor activity of T lymphocytes from infants assessed by co-culture with unfractionated adult lymphocytes in the pokeweed mitogen system. *J. Immunol.*, **123**, 1092-1096 (1979).
- 3) Yachie, A., Miyawaki, T., Nagaoki, T., Yokoi, T., Mukai, M., Uwadana, N. & Taniguchi, N.: Regulation of B cell differentiation by T cell subsets defined with monoclonal OKT4 and OKT8 antibodies in human cord blood. *J. Immunol.*, **127**, 1314-1317 (1981).
- 4) Hayward, A. R. & Lawton, A. R.: Induction of plasma cell differentiation of human fetal lymphocytes: evidence for functional immaturity of T and B cells. *J. Immunol.*, **119**, 1213-1222 (1977).
- 5) Morito, T., Bankhurst, A. D. & Williams, J. R. C.: Studies of human cord blood and adult lymphocyte interactions with in vitro immunoglobulin production. *J. Clin. Invest.*, **64**, 990-995 (1979).
- 6) Tosato, G., Magrath, I. T., Koski, I. R., Dooley, N. J. & Blaese, R. M.: B cell differentiation and immunoregulatory T cell function in human cord blood lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, **66**, 383-388 (1980).
- 7) Andersson, U., Bird, G. & Britton, S.: Cellular mechanisms of restricted immunoglobulin formation in the human neonate. *Eur. J. Immunol.*, **10**, 888-894 (1980).

- 8) Miyawaki, T., Seki, H., Taga, T., Sato, H. & Taniguchi, N.: Dissociated production of interleukin-2 and immune (γ) interferon by phytohaemagglutinin stimulated lymphocytes in healthy infants. *Clin. Exp. Immunol.*, **59**, 505-511 (1985).
- 9) Seki, H., Taga, K., Matsuda, A., Hasui, M., Miyawaki, T. & Taniguchi, N.: Phenotypic and functional characteristics of active suppressor cells against IFN- γ production in PHA-stimulated cord blood lymphocytes. *J. Immunol.*, **137**, 3158-3161 (1986).
- 10) Bryson, Y. J., Winter, H. S., Gard, S. E., Fisher, T. J. & Stiehm, E. R.: Deficiency of immune interferon production by leukocytes of normal newborns. *Cell. Immunol.*, **55**, 191-200 (1980).
- 11) Lewis, D. B., Prickett, K. S., Larsen, A., Grabstein, K. & Weaver, M.: Restricted production of interleukin 4 by activated human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 9743-9752 (1988).
- 12) Thomas, Y. L., Rogozinski, L. & Chess, L.: Relationship between T cell functional heterogeneity and human T cell surface molecules. *Immunol. Rev.*, **74**, 113-128 (1983).
- 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) Merckenschlager, M., Terry, L., Edwards, R. & Beverley, P. C. L.: Limiting dilution analysis of proliferative responses in human lymphocyte populations defined by the monoclonal antibody UCHL1: implication for differential CD45 expression in T cell memory formation. *Eur. J. Immunol.*, **18**, 1653-1661 (1988).
- 15) Sanders, M. E., Makgoba, M. W., Sharrow, S. O., Stephany, D., Springer, T. A., Young, H. A. & Shaw, S.: Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2, and LFA-1) and three other molecules (UCHL1, CDw29, and Pgp-1) and have enhanced IFN- γ production. *J. Immunol.*, **140**, 1401-1407 (1988).
- 16) 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).
- 17) 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).
- 18) Morimoto, C., Letvin, N. L., Distaso, J. A., Aldrich, W. R. & Schlossman, S. F.: The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. *J. Immunol.*, **134**, 1508-1515 (1985).
- 19) Sanders, M. E., Makgoba, M. W., June, C. H., Young, H. A. & Shaw, S.: Enhanced responsiveness of human memory T cells to CD2 and CD3 receptor-mediated activation. *Eur. J. Immunol.*, **19**, 803-808 (1989).
- 20) Byrne, J. A., Butler, J. L. & Cooper, M. D.: Differential activation requirements for virgin and memory T cells. *J. Immunol.*, **141**, 3249-3257 (1988).
- 21) Byrne, J. A., Butler, J. L., Reinherz, E. L. & Cooper, M. D.: Virgin and memory T cells have different requirements for activation via the CD2 molecule. *Int. Immunol.*, **1**, 29-35 (1989).
- 22) Matuyama, T., Anderson, P., Daley, J. F., Schlossman, S. & Morimoto, C.: CD4⁺ CD45R⁺ cells are preferentially activated through the CD2 pathway. *Eur. J. Immunol.*, **18**, 1473-1476 (1988).
- 23) Dohlsten, M., Hedlund, G., Sjogren, H.-O. & Carlsson, R.: Two subsets of human CD4⁺ T helper cells differing in kinetics and capacities to produce interleukin 2 and interferon- γ can be defined by the Leu-18 and UCHL1 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.*, **18**, 1173-1178 (1988).
- 24) Salmon, M., Kitas, G. D. & Bacon, P. A.: Production of lymphokine mRNA by CD45R⁺ and CD45R⁻ helper T cells from human peripheral blood and by human CD4⁺ T cell clones. *J. Immunol.*, **14**, 907-912 (1989).
- 25) Bottomly, K., Luqman, M., Greenbaum, L., Carding, S., West, J., Pasqualini, T. & Murphy, D. B.: A monoclonal antibody to murine CD45R distinguishes CD4 T cell populations that produce

- different cytokines. *Eur. J. Immunol.*, **19**, 617-623 (1989).
- 26) Deans, J. P., Boyd, A. W. & Pilarski, L. M.: Transitions from high to low molecular weight isoforms of CD45 (T200) involve rapid activation of alternate mRNA splicing and slow turnover of surface CD45R. *J. Immunol.*, **143**, 1233-1238 (1989).
- 27) 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**, 3887-3879 (1988).
- 28) Meuer, S. C., Hussey, R. E., Fabbi, M., Fox, D., Acuto, O., Fitzgerald, K. A., Hodgdon, J. C., Protentis, J. P., Schlossman, S. F. & Reinherz, E. L.: An alternative pathway of T-cell activation: A functional role for the 50 kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell*, **36**, 897-906 (1984).
- 29) Alcover, A., Weiss, M. J., Daley, J. F. & Reinherz, E. L.: The T11 glycoprotein is functionally linked to a calcium channel in precursor and mature T-lineage cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**, 2614-2618 (1986).
- 30) Miyawaki, T., Kasahara, Y., Taga, K., Yachie, A. & Taniguchi, N.: Differential expression of CD45RO (UCHL1) and its functional relevance in two subpopulations of circulating TCR- $\gamma\delta^+$ lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **171**, 1833-1838 (1990).
- 31) Geppert, T. G. & Lipsky, P. E.: Accessory cell independent proliferation of human T4 cells stimulated by immobilized monoclonal antibodies to CD3. *J. Immunol.*, **138**, 1660-1666 (1987).
- 32) 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).
- 33) Yeh, C.-J. G., Hsi, B.-L. & Faulk, W. P.: Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence: II. Use with cellular identification and viability studies. *J. Immunol. Methods*, **43**, 269-275 (1981).
- 34) Alcover, A., Ramarli, D., Richardson, N. E., Chang, H.-C. & Reinherz, E. L.: Functional and molecular aspects of human T lymphocyte activation via T3-Ti and T11 pathways. *Immunol. Rev.*, **95**, 5- (1987).
- 35) Hafler, D. A., Chofflon, M., Benjamin, D., Dang, N. H. & Breitmeyer, J.: Mechanisms of immune memory: T cell activation and CD3 phosphorylation correlates with Ta₁ (CDw26) expression. *J. Immunol.*, **142**, 2590-2595 (1989).
- 36) Clement, L. T., Yamashita, N. & Martin, A. M.: The functionally distinct subpopulations of human CD4⁺ helper/inducer T lymphocytes defined by anti-CD45R antibodies derive sequentially from a differentiation pathway that is regulated by activation-dependent post-thymic differentiation. *J. Immunol.*, **141**, 1464-1470 (1988).
- 37) Hayward, A. R., Lee, J. & Beverley, P. C. L.: Ontogeny of expression of UCHL1 antigen on TcR-1⁺ (CD4/8) and TcR δ^+ T cells. *Eur. J. Immunol.*, **19**, 771-773 (1989).
- 38) Pirruccello, S. J., Collins, M., Wilson, J. E. & McManus, B. M.: Age-related changes in naive and memory CD4⁺ T cells healthy human children. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **52**, 341-345 (1989).
- 39) Papadogiannakis, N., Johnsen, S.-A. & Olding, L. B.: Monocyte-regulated hyporesponsiveness of human cord blood lymphocytes to OKT3-monoclonal-antibody-induced mitogenesis. *Scand. J. Immunol.*, **23**, 91-102 (1986).
- 40) Gerli, R., Bertotto, A., Crupi, S., Arcangeli, C., Marinelli, I., Spinozzi, F., Cernetti, C., Angelella, P. & Rambotti, P.: Activation of cord lymphocytes. I. Evidence for a defective T cell mitogenesis induced through the CD2 molecule. *J. Immunol.*, **142**, 2583-2589 (1989).
- 41) Mayumi, M., Kuritani, T., Kubagawa, H. & Cooper, M. D.: IgG subclass expression by human B lymphocytes and plasma cells: B lymphocytes precommitted to IgG subclass can be preferentially induced by polyclonal mitogens with T cell help. *J. Immunol.*, **130**, 671-677 (1983).

Significance of CD45 Antigen on Differential Maturation of Human Neonatal CD4 Antigen Positive T Cells (CD4 Cells) Yoshihito Kasahara, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 99, 749—764 (1990)

Key words neonatal CD4 cells, CD45 antigen, helper activity, suppressor activity, memory and naive CD4 cells

Abstract

Adult CD4 cells can be divided into the memory and naive cell populations on the basis of the differential expression of isoforms of CD45. The UCHL1 mAb against CD45RO identifies the memory CD4 cells that respond to soluble recall antigens, whereas the naive population of CD4 cells is detectable by anti-CD45RA mAb. In the present study, we examined the relationship between the functional properties of neonatal CD4 cells and their expression of CD45 isoforms. Almost all the neonatal CD4 cells showed the naive phenotype (CD45RO⁻, CD45RA⁺) and the proportions of CD45RO⁺ CD4 cells in the blood increased with age. Corresponding to their naive phenotype, neonatal CD4 cells appeared to behave in a similar fashion to adult naive (CD45RO⁻) CD4 cells. Neonatal CD4 cells and two adult CD4 subpopulations, CD45RO⁺ and CD45RO⁻, were reactive with mitogens in a similar manner. Adult memory (CD45RO⁺) CD4 cells responded well to purified protein derivative (PPD) as one of the recall antigens, but neither neonatal CD4 nor adult naive (CD45RO⁻) CD4 cells did. Although adult memory CD4 cells respond strongly to activation via CD3 and CD2 molecules, proliferation induced by anti-CD3 and anti-CD2 mAbs was minimal in neonatal CD4 cells as well as adult naive CD4 cells. Adult memory CD4 cells preferentially provided help for the PWM-driven Ig-production of B cells. The functional properties of neonatal CD4 cells were characterized by negligible help and a very strong suppression of the Ig-production of B cells. After stimulation with phytohemagglutinin (PHA) and propagation in the presence of interleukin-2 (IL-2), neonatal CD4 cells came to express the memory phenotype (CD45RO⁺, CD45RA⁻), accompanied by the acquisition of some memory cell-like functions, such as a helper function for the PWM-induced Ig-production of B cells and anti-CD3- or anti-CD2-mediated responsiveness. Although such cultured neonatal CD4 cells could be triggered by stimulation with anti-CD3 and anti-CD2 mAb, they were still low in helper activity in Ig production, especially for IgA induction, as compared with adult memory CD4 cells. In contrast, cultured adult naive CD4 cells, along with culture-induced phenotype conversion, acquired efficient helper activity in Ig-production comparable to that of memory CD4 cells. These results suggested that, though respective phenotype expression in both neonatal CD4 cells and adult naive CD4 cells were nearly the same in fresh and cultured states, neonatal CD4 cells might be still immature in their functional aspects, as compared to adult naive CD4 cells.