

# Regulatory Roles of PHA-stimulated T-cell Subsets on Erythroid Burst-Forming Units(BFU-E) Growth in Healthy Individuals and in Patients with Congenital Hypoplastic Anemia(CHA): Functional Impairment of T4+ Lymphocytes in the Active Stage of CHA

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7963">http://hdl.handle.net/2297/7963</a>

# Phytohemagglutinin 刺激T細胞サブセットによる 赤血球系幹細胞の分化増殖調節機序

—先天性赤芽球癆における検討—

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

堀 田 成 紀

(昭和62年6月22日受付)

先天性赤芽球癆 (congenital hypoplastic anemia, CHA)における赤血球造血障害の機序を明らかにする為、まず正常末梢血赤血球系幹細胞 (erythroid burst-forming units, BFU-E) 調節における非自己 phytohemagglutinin (PHA) 刺激 T細胞サブセットの役割を調べ、さらに CHA 各 stage での末梢血 T細胞サブセットと対比した。非附着細胞, T細胞, T4<sup>+</sup>細胞および T8<sup>+</sup>細胞を 1.0% PHA 存在下で 20 時間培養し、各分画の末梢血 BFU-E への作用を検討した。また各培養上清中の赤血球系幹細胞刺激活性 (burst-promoting factor, BPF) の有無についても検討した。正常末梢血 PHA 刺激 T細胞は BFU-E 増加作用を示し、この作用は T細胞分画中の T4<sup>+</sup>細胞が主役であった。T細胞および T4<sup>+</sup>細胞培養上清中には BPF が認められ、PHA 刺激 T4<sup>+</sup>細胞が BPF 産生を介して BFU-E 増加作用を示すと考えられた。この BPF は、コロニー数の増加のみならず 1個のコロニー当りの細胞数の増加およびヘモグロビン合成促進作用も有していた。active stage 4例, transfusion-dependent stage 2例の CHA で同様の検討を行ったが、PHA 刺激 T4<sup>+</sup>細胞の BPF 産生能に障害が見られた。active stage 4例はステロイド剤によって完全寛解となったが、4例中 2例で PHA 刺激 T細胞あるいは T4<sup>+</sup>細胞は BFU-E を増加させた。また 4例全例で培養上清中に BPF 活性が見い出され、BPF 産生能は回復していた。すなわち、CHA では active stage で T4<sup>+</sup>細胞の BPF 産生障害があり、これが赤血球造血障害の一因と考えられた。しかし、血液学的完全寛解後も末梢血 BFU-E 数が低値であったこと、正常 T4<sup>+</sup>細胞の添加にても形成されるコロニー数が低値であったこと、から完全寛解後も幹細胞自体の内的障害 (BPF 反応性低下) が残存している可能性も示唆された。

---

**Key words** erythroid burst-forming units, burst-promoting factor, congenital hypoplastic anemia, PHA-stimulated T4<sup>+</sup> cell

---

先天性赤芽球癆 (congenital hypoplastic anemia, CHA) は乳幼児期発症の赤血球系のみで低形成を特徴とする疾患である<sup>1)2)</sup>。in vitro コロニー法の進法で、赤血球造血のメカニズムの解明や種々の疾患における造血異常の病態の解明が可能になって来ている。CHA での赤血球造血障害の機序に関しても多くの報告が見られる<sup>3)~12)</sup>。しかし、その成因に関して依然不明の点が多く残されている。自己骨髓赤血球系幹細胞の増殖を

抑制する細胞障害性リンパ球の存在が<sup>3)</sup>、Hoffman ら<sup>3)</sup> や Steinberg ら<sup>4)</sup>によって報告されているが、この説を否定する報告も見られる<sup>5)6)</sup>。また骨髓幹細胞のエリスロポエチンへの反応性が低下している為、幹細胞から前赤芽球への分化障害が起っている<sup>7)~10)</sup>、との報告も見られ、CHA は成因の上で異質性 (heterogeneity) の多い疾患群であると考えられる。

一方、正常の赤血球造血では、その前駆細胞が増殖

---

BFU-E, erythroid burst-forming units; BPF, burst-promoting factor; CHA, congenital hypoplastic anemia; Epo, erythropoietin; NA T<sup>-</sup>, nonadherent T-depleted; PHA, phytohemagglutinin; PHA-TCM, PHA-stimulated T-cell conditioned medium; PHA-T4CM,

分化する上で、エリスロポエチンおよび赤血球系幹細胞増殖刺激因子 (burst-promoting factor, BPF) が必須であり、末梢血細胞群の中では T 細胞<sup>14)~17)</sup>や単球<sup>18)~21)</sup>が BPF 産生細胞の主役と考えられている。

今回、レクチン刺激末梢血 T 細胞サブセットによる末梢血赤血球系幹細胞 (erythroid burst-forming units, BFU-E) 調節機構を明らかにし、赤血球系低形成を特徴とする CHA 6 例について同様の検討を行い、新しい知見を得たので報告する。

また、CHA 末梢血リンパ球の正常骨髓赤血球系幹細胞の障害の有無についても検討を加えた。

### 対象および方法

#### I. 対 象

Diamond ら<sup>1)</sup>の診断基準を満たす 6 例の CHA を対象とした。表 1 は診断時の末梢血および骨髓所見、臨床経過を示したものである。全例末梢血では白血球減少および血小板減少を伴わない高度の貧血を認め、骨

髄像では著しい赤芽球低形成を示していた。症例 4 および 6 は治療開始前に、症例 2 および 5 は 2 回の濃厚赤血球輸注後に検討した。これら 4 症例はいずれもステロイド反応例で、1 ヶ月から 2 ヶ月の治療で完全寛解となり以後徐々にステロイド剤は減量され、約 6 ヶ月から 12 ヶ月で中止された。第 2 回目の検討では、全例がステロイド剤や輸血を必要としなくなっていた。症例 1 および 3 はステロイド不応例で、月 1 回の濃厚赤血球輸注を繰返していた。

#### II. T 細胞の分離

CHA 6 例と正常対照として健康成人末梢血をヘパリン加採血し、リン酸緩衝生理食塩水で 2 倍に希釈後、Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nyegaard & Co., Oslo, Norway) を用いた比重遠心法にて単核細胞を採取した。単核細胞は 10% 非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS, M.A. Bioproducts, Walkersville, MD) を含む RPMI 1640 培地 (GIBCO, NY) に  $1 \times 10^6$ /ml の濃度に浮遊し、プラスチック皿を用いて付着

Table 1. Laboratory data at diagnosis and clinical courses.

Patient	1.(R.U.)	2.(K.I.)	3.(T.G.)	4.(M.N.)	5.(T.M.)	6.(I.N.)
Age at diagnosis	11 mo	3 mo	3 mo	6 mo	6 mo	8 mo
Peripheral blood						
Red blood cells ( $\times 10^4$ /mm <sup>3</sup> )	162	83	102	158	159	202
Hemoglobin (g/dl)	4.7	2.8	3.6	4.4	3.9	4.2
White blood cells (/mm <sup>3</sup> )	7300	3600	3600	5700	8300	7400
Platelets ( $\times 10^4$ /mm <sup>3</sup> )	30.4	22.4	25.6	44.1	43.8	15.0
Reticulocytes (%)	0	0.5	0.5	0	0	0.1
Bone marrow						
Erythroblasts (%)	1.6	4.0	2.0	0.2	1.4	5.6
G/E ratio	48.0	11.3	23.3	167.0	55.0	13.0
Therapy	pred andr	pred	pred andr	pred	pred	pred
Prognosis	Trans	remission	Trans	remission	remission	remission
Age at time of study	12yr	4 mo, 3yr	16yr	6 mo, 3yr	7 mo, 2yr	8 mo, 3yr

G/E ratio, Granulocyte/Erythroid ratio; pred, prednisone; andr, androgen; Trans, Transfusion-dependent.

PHA-stimulated T4<sup>+</sup>-cell conditioned medium; PHA-T8CM, PHA-stimulated T8<sup>+</sup>-cell conditioned medium.

細胞の単球を除去した(非付着細胞)。T細胞は $1 \times 10^7$ /mlの非付着細胞をノイラミダグゼ(10 u/ml, Behringwerke)処理羊赤血球とのEロゼット法を行い分離した<sup>22)</sup>。T細胞および非付着非T細胞(nonadherent T-depleted, NA T<sup>-</sup>)分画中の単球の比率をメイ・ギムザ、 $\alpha$ -ナフチール・ブチレート・エステラーゼ染色を行い検討したが、いずれも4%以下であった。

### III. T細胞サブセットの解析と分離

末梢血T細胞サブセットの解析は、単核細胞をfluorescein isothiocyanate (FITC) 標識モノクローナル抗体OKT3, OKT4, OKT8 (Ortho Diagnostic System Inc., Raritan, NJ)にて標識し、フローサイトメトリー(Ortho Spectrum III)を用いて算定した<sup>23)</sup>。

T4<sup>+</sup>およびT8<sup>+</sup>細胞の分離は、末梢血T細胞 $5 \times 10^6$ /mlにOKT8あるいはOKT4モノクローナル抗体(1:100)を加え室温30分放置後補体(Low-Tox-H rabbit complement, Cedarlane, Ontario, Canada)を25%濃度に加え、さらに37°C 45分間インクベートののちにRPMI1640培地で2回洗浄した<sup>24)25)</sup>。OKT8処理T細胞分画をT4<sup>+</sup>細胞、OKT4処理T細胞をT8<sup>+</sup>細胞として以下の検索に使用した。フローサイトメトリーによる解析では、前者は78%から85%のOKT4陽性細胞を有し後者は82%から86%のOKT8陽性細胞を有していた。

### IV. PHAによるT細胞, T4<sup>+</sup>細胞およびT8<sup>+</sup>細胞刺激

$5 \times 10^6$ 個のT細胞, T4<sup>+</sup>細胞, T8<sup>+</sup>細胞を10% FBSを含むRPMI1640培地に浮遊し、PHA-P (Difco, Detroit, MI)を最終濃度1.0%になる様に加え炭酸ガス培養恒温器(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)内で20時間培養した。培養終了後、多量のRPMI 1640培地にて2回洗浄し赤血球系幹細胞培養でのエフェクター細胞として用いた。一部の実験では非付着細胞を同様に処理しエフェクター細胞とした。0.16%トリパンブルーによる検定では83%以上が生細胞であった。また各々の培養上清(PHA刺激T細胞培養上清, PHA-TCM; PHA刺激T4<sup>+</sup>細胞培養上清 PHA-T4CM; PHA刺激T8<sup>+</sup>細胞培養上清, PHA-T8CM)も同様に回収し-20°Cで保存し、使用の際に自然融解し用いた。

### V. 培養上清の耐熱性

各培養上清を56°C 30分, 100°C 10分および30分熱処理し10%の濃度でBFU-E培養系に添加し、熱処理後のBPF活性の変化を検討した。

### VI. 赤血球系幹細胞培養法

ヒト末梢血赤血球系幹細胞の培養はIscoveら<sup>26)</sup>の

方法に準じて行った。 $2.5 \times 10^6$ 個の非自己NA T<sup>-</sup>細胞をBFU-E sourceとして、2.0 IU/mlのエリスロポエチン(Epo, Connaught Step III sheep erythropoietin)存在下で0.8%メチルセルロース(Fisher Scientific Co., NJ), 30% FBS, 10%脱イオン化ウシ胎児アルブミン(Sigma),  $10^{-4}$  M 2-メルカプトエタノール(Sigma)を含んだメチルセルロース法にて行った。炭酸ガス培養恒温器で14日間培養後倒立顕微鏡にて100個以上の赤色から黄赤色の細胞集団および3個以上のサブコロニーから成る細胞集団をBFU-E由来のコロニーとして算定した。

エフェクター細胞は上記培養系に $1.25 \times 10^6$ 個の割合で加えBFU-Eへの影響について検討した。各培養上清(熱処理後の上清も含め)はBPF活性の有無を検討する為、最終濃度10%になる様に1.5 IU/ml Epoと共に加えた。混合培養ではstimulation indexを下記の式に基づいて算定した。stimulation index (S.I.)=混合培養での全BFU-E数/単核細胞あるいはNA T<sup>-</sup>細胞単独でのBFU-E数+PHA刺激非付着細胞あるいはT細胞単独でのBFU-E数

また、骨髓赤血球系前駆細胞(colony-forming units of erythroid, CFU-E)の培養は、末梢血と同様の方法で採取した骨髓細胞( $2 \times 10^6$ )をCFU-E sourceとしてTeppermanら<sup>27)</sup>の血漿凝固法を用いて行った。エフェクター細胞を $1 \times 10^6$ 個の割合で加え37°C 5% CO<sub>2</sub>下で培養し7日目にヘモグロビン(ベンチジン)染色を行い、ベンチジン陽性の8個以上の細胞集団をCFU-E由来のコロニーとして算定した。

### VII. 統計学的検定

有意差の検定にはStudentのt検定を用いて、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

## 成 績

### I. 正常ヒト末梢血BFU-Eの調節

#### 1. 非自己T細胞の末梢血BFU-Eに及ぼす影響

非自己T細胞に各濃度(0, 0.1%, 1.0%)のPHAを添加し培養した後、 $1.25 \times 10^6$ 個,  $2.5 \times 10^6$ 個および $5.0 \times 10^6$ 個のT細胞をBFU-E培養系に加え、その影響を検討した(図1)。T細胞はPHA添加の有無にかかわらずBFU-E形成を増加させ、さらに添加T細胞数に比例してBFU-E増加作用を示した。1.0% PHAを加え培養した場合 $1.25 \times 10^6$ 個のT細胞添加でも、他のPHA濃度の場合に比し有意に( $p < 0.02$ ) BFU-E形成を増加させた。PHA濃度を2.0%とした場合、生細胞数は20%以下になった為、以下の検索ではPHA濃度1.0%、エフェクター細胞数 $1.25 \times 10^6$ とし

て BFU-E 培養系に添加した。

## 2. PHA 刺激 T 細胞サブセットによる検討

健康成人 5 名で PHA 刺激 T 細胞サブセット (T 細胞, T4<sup>+</sup> 細胞および T8<sup>+</sup> 細胞) の BFU-E 形成に及ぼす影響について検討した (図 2)。BFU-E source としての末梢血 NA T<sup>-</sup> 細胞と PHA 刺激 T 細胞を混合培養した場合形成されるコロニー数 (44±12) は, NA T<sup>-</sup> 細胞単独で形成されるコロニー数 (20±8) と PHA 刺激 T 細胞単独で形成されるコロニー数 (2±1) の総和に比し, 有意に ( $p < 0.02$ ) 増加していた。この様なコロニー形成刺激作用は T4<sup>+</sup> 細胞との混合培養でも同様に認められた (45±12,  $p < 0.02$ ) が, T8<sup>+</sup> 細胞では認められなかった (24±1)。

また, BFU-E source として末梢血単核細胞を用いて, PHA 刺激非付着細胞, T4<sup>+</sup> 細胞および T8<sup>+</sup> 細胞と混合培養した場合も同様の結果を得た。自己単球の存在下では形成されるコロニー数は増加する傾向にあったが, 非付着細胞を BFU-E source とした場合と有意差は認められなかった。非付着細胞をモノクローナル抗体 OKT11 と補体処理を行った後 PHA 刺激培養系に添加すると, PHA 刺激非付着細胞による BFU-E 増加作用は消失した。

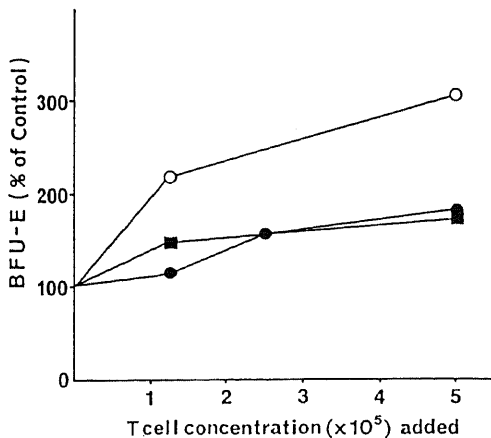


Fig. 1. Effects of allogeneic T cells on blood BFU-E growth.

Allogeneic T cells ( $5 \times 10^6$ /ml) were preincubated with (0.1% ■—■ or 1.0% ○—○) or without (●—●) PHA-P for 20 hours, and graded numbers of T cells ( $1.25, 2.5, \text{ and } 5.0 \times 10^5$ ) were added to the BFU-E assay system, using nonadherent T-depleted (NA T<sup>-</sup>) cells ( $2.5 \times 10^5$ ) as BFU-E sources. Data represent the mean number of BFU-E of two individual experiments and are expressed as % of control. The mean number of BFU-E in controls (NA T<sup>-</sup> cells alone) was  $20 \pm 6/2.5 \times 10^6$  cells.

さらに, PHA 刺激細胞の添加にて形成されるコロニーサイズは増加し, また 1 個のコロニーの赤色調も強くなった。すなわち, PHA 刺激 T11<sup>+</sup>, T4<sup>+</sup> 細胞が BFU-E 形成の主役と考えられ, コロニー数の増加のみならず 1 個のコロニー当りの細胞数の増加およびヘモグロビン合成促進を示すと考えられた。

## 3. 培養上清の BFU-E に及ぼす影響

PHA 刺激 T 細胞サブセットによる BFU-E 増加作用が, T4<sup>+</sup> 細胞の BFU-E への直接作用かあるいは T4<sup>+</sup> 細胞から分泌される因子を介する間接的作用か否かを検討する為, 各培養上清 (PHA-TCM, PHA-T4CM, PHA-T8CM) を最終濃度 10% で BFU-E 培養系に添加した (表 2)。PHA-TCM および PHA-T4CM は有意に ( $p < 0.01$ ) BFU-E 形成を増加させたが, PHA-T8CM にはこの様な BPF 活性は認めなかった。また PHA-TCM および PHA-T4CM は添加濃度に比例し BFU-E 形成を増加させた (図 3)。これ

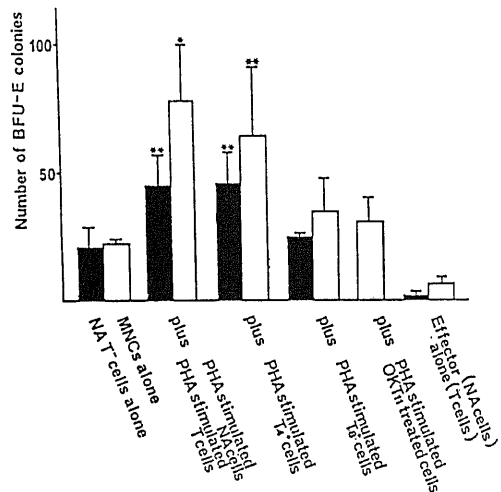


Fig. 2. Effects of PHA-stimulated allogeneic unfractionated T cells and fractionated T-cell subsets on blood BFU-E growth.

Allogeneic T-cell subsets were separated by negative selection using OKT4 or OKT8 monoclonal antibody and complement. Separated T-cell subsets were preincubated with 1.0% PHA-P, as described in Materials and Methods.  $1.25 \times 10^5$  cells of each fraction were used as effector cells. Blood nonadherent T-depleted (NA T<sup>-</sup> ■;  $2.5 \times 10^5$ ) cells or mononuclear cells (MNCs □;  $2.5 \times 10^5$ ) were used as BFU-E sources. Data indicate the mean number ± S.D. in five separate experiments. \* $p < 0.01$ . \*\* $p < 0.02$  compared with the calculated sum of BFU-E from NA T<sup>-</sup> cells or MNCs alone plus PHA-stimulated NA or T cells alone.

Table 2. Effects of cultured conditioned media from PHA-stimulated unfractionated T cells, fractionated T4<sup>+</sup> and T8<sup>+</sup> cells.

CM source	Nonadherent T-depleted (NA T <sup>-</sup> ) cells with PHA-P (0.1%)	CM added		
		PHA-TCM	PHA-T4 CM	PHA-T8 CM
( BFU-E / 2.5 × 10 <sup>5</sup> )				
1.	26 ± 2	42 ± 3**	—	—
2.	36 ± 6	—	68 ± 3***	40 ± 3
3.	41 ± 15	—	135 ± 32**	—
4.	31 ± 1	81 ± 8***	90 ± 2***	25 ± 2

Unfractionated T cells, fractionated T4<sup>+</sup> or T8<sup>+</sup> cells were incubated with 1.0% PHA-P for 20 hours. Each conditioned media (CM) was harvested and added to the BFU-E assay system, using nonadherent T-depleted (NA T<sup>-</sup>) cells (2.5 × 10<sup>5</sup>) as the BFU-E source. Data represent the mean number of BFU-E ± S.D. of triplicate cultures. PHA-TCM, PHA-stimulated T-cell conditioned medium; PHA-T4 CM, PHA-stimulated T4<sup>+</sup>-cell conditioned medium; PHA-T8 CM, PHA-stimulated T8<sup>+</sup>-cell conditioned medium. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 compared with BFU-E from NA T<sup>-</sup> cells with 0.1% PHA-P.

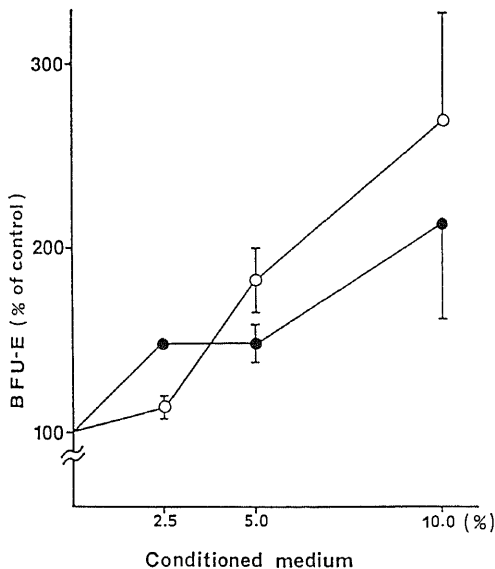


Fig. 3. Dose-response curves of conditioned media from PHA-stimulated T cells and T4<sup>+</sup> cells. PHA-stimulated T-cell (●-●) and T4<sup>+</sup>-cell (○-○) conditioned media were added to the BFU-E assay system at the concentration of 2.5, 5.0, and 10.0% (v/v). Data represent the mean number of BFU-E ± S.D. of three separate experiments and are expressed as % of control. The number of controls (without conditioned medium) was 26 ± 5/2.5 × 10<sup>5</sup> cells.

らの上清中の BPF 活性は 100°C 10 分以上の熱処理で失活した (図 4)。

## II. CHA 6 例での検討

### 1. CHA 末梢血 T 細胞サブセットの解析

表 3 に示す様に, active stage では 6 例中 3 例 (症例 4, 5, および 6) において OKT4 陽性細胞の比率の低下, OKT8 陽性細胞の比率の増加を認めた。この T4/T8 比の逆転は血液学的寛解 2~3 年後でも正常化していなかった。また症例 2 は診断時には T4/T8 比は正常範囲内であったが, 完全寛解後には OKT8 陽性細胞の増加にて逆転した。ステロイド不応例である症例 1 および 3 では, T4/T8 比は正常範囲であった。

### 2. 正常ヒト骨髓 CFU-E に及ぼす CHA 末梢血リンパ球サブセットの影響

CHA 5 例 (症例 6 を除く) で末梢血単核細胞を, 3 例 (症例 1, 2, 3) で T 細胞および T8<sup>+</sup> 細胞 1 × 10<sup>5</sup> 個をレクチン無刺激で正常ヒト骨髓単核細胞 2 × 10<sup>5</sup> 個と混合培養し CFU-E への影響を検討した (図 5)。症例 3 において, 末梢血単核細胞が約 30% の CFU-E の抑制を示したが有意差は認められなかった。他の症例では, いずれも正常ヒト骨髓 CFU-E の抑制は認めず, Hoffman らの報告した CFU-E 障害性リンパ球の存在を証明しなかった。

### 3. active stage および transfusion-dependent stage の患児末梢血 PHA 刺激 T 細胞サブセットの BFU-E 形成に及ぼす影響

active stage (症例 4, 5, 6), transfusion-depend-

ent stage (症例 1, 3) の CHA 末梢血非付着細胞および  $T4^+$  細胞は, PHA 刺激後も正常ヒト末梢血 BFU-E 増加作用を示さなかった (表 4). 正常末梢血非付着細胞あるいは  $T4^+$  細胞を添加した場合には, 各々 stimulation index (S.I.) =  $2.77 \pm 0.61$  (SD),  $2.30 \pm 0.80$  (SD) でいずれも 1.50 以上 (50% 以上増加) であったが, CHA ではいずれの症例も 1.50 以下であった. また 2 症例 (3, 6) で PHA 刺激  $T8^+$  細胞での検討を行っているが, BFU-E 形成には何らの影響を及ぼさなかった. 症例 3 では PHA 刺激 T 細胞を

エフェクター細胞として  $NAT^-$  細胞 (BFU-E source) と混合培養しているが, S.I. = 1.15 で有意の増加作用を示さなかった.

#### 4. 寛解期 CHA 4 例の PHA 刺激 T 細胞サブセットによる検討

表 5 に完全寛解となった 4 例の PHA 刺激 T 細胞,  $T4^+$  細胞と正常ヒト  $NA^-$  細胞 (BFU-E source) との混合培養の結果を示す. 患児末梢血 PHA 刺激 T 細胞単独では 2 個以上の BFU-E コロニー形成は見られなかった. 症例 2 は, T 細胞添加で S.I. = 1.60 と低値であったが,  $T4^+$  細胞添加で正常対照群と同程度に BFU-E を増加させた (S.I. = 1.72). 症例 4 は T 細胞

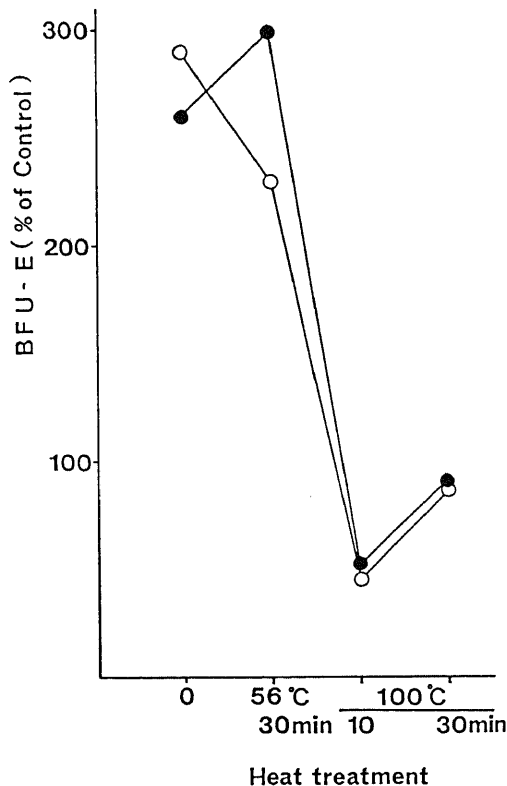


Fig. 4. Heat stability test for BPF in T-cell and  $T4^+$  cell conditioned media.

PHA-stimulated T-cell (●—●) and  $T4^+$  cell conditioned media (○—○) were prepared as described in Materials and Methods, and then subjected to incubation at 56°C for 30 minutes, 100°C for 10 minutes, and 100°C for 30 minutes. After incubation, the media were assayed for BPF by testing their ability to stimulate BFU-E growth. Data represent the mean number of BFU-E of two individual experiments and are expressed as % of control. The number of BFU-E in controls (without conditioned medium) was  $20 \pm 4 / 2.5 \times 10^5$  cells.

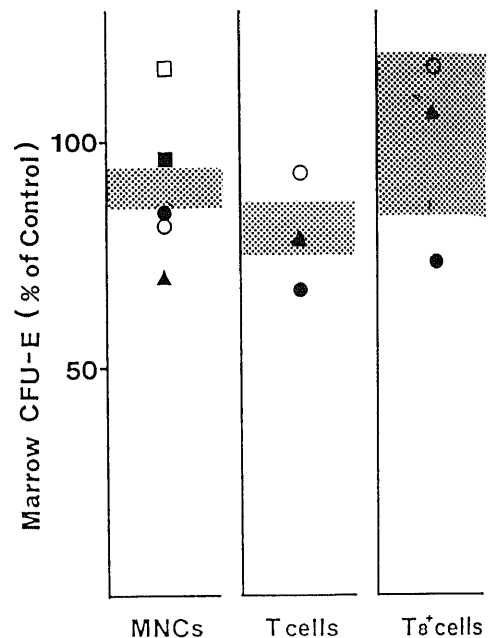


Fig. 5. Effects of lymphocytes from patients in the active stage and the transfusion-dependent stage on normal marrow CFU-E.

Blood mononuclear cells (MNCs), T cells, and fractionated  $T8^+$  cells ( $1.0 \times 10^5$ ) were cocultured with normal marrow mononuclear cells ( $2.0 \times 10^5$ ) as CFU-E sources in the plasma clot system. Data represent the mean number of CFU-E and are expressed as % of control (marrow MNCs alone). Control values (shaded) indicate the mean number of CFU-E  $\pm$  S.D. of five separate experiments, in which normal blood MNCs, T cells, and  $T8^+$  cells were cocultured with allogeneic marrow MNCs. The mean number of CFU-E in controls (marrow MNCs alone) was  $202 \pm 73 / 2.0 \times 10^5$  cells. ● patient 1, ○ patient 2, ▲ patient 3, ■ patient 4, □ patient 5.

および T4<sup>+</sup> 細胞共に BFU-E 増加を求めた (S.I.= 2.72, 2.53)。しかし、症例 5 の T 細胞、症例 6 の T および T4<sup>+</sup> 細胞は、児が完全寛解にあるにもかかわらず有意の BFU-E 増加作用を示さなかった。これは、症例 5 および 6 では T 細胞中の T4<sup>+</sup> 細胞の比率が低値 (16.4%, 19.6%) であったこと、症例 6 ではエフェク

ター細胞 (T4<sup>+</sup> 細胞) 数が  $0.6 \times 10^6$  と少なかったことが原因と考えられた。  $5 \times 10^6$  個の T 細胞あるいは T4<sup>+</sup> 細胞を 1.0% PHA 存在下で培養して得た上清 (PHA-TCM, PHA-T4CM) は、症例 5 および 6 共に有意に ( $p < 0.01$ ) BFU-E 形成を増加させた (表 7)。また、症例 3 (ステロイド不応例) の PHA-TCM は

Table 3. T-cell subsets in peripheral blood of patients with CHA.

Patient	In active stage				In remission (off corticosteroid)			
	T3 <sup>+</sup> cells (%)	T4 <sup>+</sup> cells (%)	T8 <sup>+</sup> cells (%)	T4/T8	T3 <sup>+</sup> cells (%)	T4 <sup>+</sup> cells (%)	T8 <sup>+</sup> cells (%)	T4/T8
1.*	55.0	34.0	12.3	2.76				
2.	58.2	33.0	26.0	1.27	71.0	27.4	42.8	0.64
3.*	80.6	45.1	33.7	1.34				
4.	54.8	24.5	36.8	0.69	69.6	24.4	38.5	0.63
5.	52.4	23.8	28.0	0.85	67.4	16.4	65.4	0.25
6.	64.5	26.7	37.0	0.72	75.1	19.6	76.9	0.12
Controls								
(3mo-3yr ; n=4)	68.1 ± 5.1	42.6 ± 8.6	20.9 ± 3.5	2.11 ± 0.70				
(adults ; n=8)	67.1 ± 5.4	40.2 ± 4.1	25.8 ± 3.5	1.60 ± 0.39				

T-cell subsets were enumerated by the direct immunofluorescence method, as described in Materials and Methods. \* At the time of study, patient 1 and 3 were 12 and 16 years old, respectively. Data of controls indicate the mean  $\pm$  S.D.

Table 4. Effects of PHA-stimulated nonadherent cells, fractionated T4<sup>+</sup> and T8<sup>+</sup> cells from patients in the active stage and the transfusion-dependent stage on blood BFU-E proliferation.

Patient	Normal blood mononuclear cells (MNCs) alone (BFU-E source)	Nonadherent (NA) cells alone from the patients	MNCs plus NA cells from the patients	MNCs plus T4 <sup>+</sup> cells from the patients	MNCs plus T8 <sup>+</sup> cells from the patients
	(BFU-E/ $2.5 \times 10^6$ )	(BFU-E/ $1.25 \times 10^6$ )	( BFU-E / $3.75 \times 10^6$ )		
1.*	12 $\pm$ 2	1 $\pm$ 0	16 $\pm$ 3 (1.23)	12 $\pm$ 4 (0.92)	—
3.*	18 $\pm$ 2	0	15 $\pm$ 1 (0.83)	14 $\pm$ 1 (0.78)	18 $\pm$ 4 (1.00)
4.	24 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	26 $\pm$ 5 (1.04)	20 $\pm$ 6 (0.80)	—
5.	20 $\pm$ 4	0	24 $\pm$ 3 (1.20)	16 $\pm$ 4 (0.80)	—
6.	11 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0	10 $\pm$ 2 (0.83)	16 $\pm$ 4 (1.33)	9 $\pm$ 6 (0.75)
Controls (n=5)	22 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2	77 $\pm$ 22 (2.77 $\pm$ 0.61)	63 $\pm$ 24 (2.30 $\pm$ 0.80)	34 $\pm$ 13 (1.22 $\pm$ 0.38)

T4<sup>+</sup> or T8<sup>+</sup> cells were fractionated from nonadherent (NA) cells by complement-mediated cytotoxicity using OKT8 or OKT4 monoclonal antibody, respectively. NA cells, fractionated T4<sup>+</sup> and T8<sup>+</sup> cells ( $1.25 \times 10^6$ ) after pretreatment with 1.0% PHA-P were added to the BFU-E assay system as described in Materials and Methods. Data represent the mean number of BFU-E  $\pm$  S.D. of triplicate cultures.

The numbers in parenthesis are stimulation indices. \* Patient 1 and 3 were transfusion-dependent.



BFU-E 形成増加を認めなかった。

5. CHA 末梢血 BFU-E の PHA 刺激正常 T 細胞サブセット添加による影響

表 6 に示す様に、血液学的に完全寛解ののちも患児末梢血 NA T<sup>-</sup> 細胞由来の BFU-E 数は低値であった。PHA 刺激 T 細胞および T4<sup>+</sup> 細胞は有意に (p <

0.05), 完全寛解中の患児の BFU-E 数を増加させた。また、ステロイド不応例 (症例 3) でも正常 T 細胞の添加で BFU-E 数は増加した (S.I.=2.00)。しかし、いずれの症例も PHA 刺激 T 細胞サブセット添加によっても、形成されるコロニー数は正常対照群に比して低値であった。

Table 5. Effects of PHA-stimulated T cells and fractionated T4<sup>+</sup> cells from four patients in remission on normal blood BFU-E growth.

Patient	Normal blood nonadherent T-depleted (NA T <sup>-</sup> ) cells alone (BFU-E source)	T cells alone from the patients	NA T <sup>-</sup> cells plus T cells from the patients	NA T <sup>-</sup> cells plus T4 <sup>+</sup> cells from the patients
	(BFU-E/2.5 × 10 <sup>5</sup> )	(BFU-E/1.25 × 10 <sup>5</sup> )	( BFU-E / 3.75 × 10 <sup>5</sup> )	
2.	25 ± 2	0	40 ± 11** (1.60)	43 ± 13*** (1.72)
4.	41 ± 3	2 ± 1	117 ± 10* (2.72)	109 ± 3* (2.53)
5.	16 ± 4	0	21 ± 2# (1.31)	—
6.	36 ± 6	1 ± 1	34 ± 6# (0.92)	30 ± 3## (0.81)
Controls (n=5)	20 ± 8	2 ± 1	44 ± 12** (2.10 ± 2.20)	45 ± 12** (2.01 ± 0.40)

T4<sup>+</sup> cells were fractionated from T cells by complement-mediated cytotoxicity. Unfractionated T cells and fractionated T4<sup>+</sup> cells were pretreated with 1.0% PHA-P for 20 hours. 1.25 × 10<sup>5</sup> cells of each fraction were added to the BFU-E assay system, using NA T<sup>-</sup> cells as the BFU-E source. Data represent the mean number of BFU-E ± S.D. of triplicate cultures. The numbers in parenthesis are stimulation indices. # Decreased percentages of OKT4<sup>+</sup> cells (16.2%, 19.6%) were found in patient 5 and 6, respectively. ## 0.6 × 10<sup>5</sup> T4<sup>+</sup> cells were added to the BFU-E assay system. \*p < 0.001, \*\*p < 0.02, \*\*\*p < 0.05 compared with the calculated sum of BFU-E from NA T<sup>-</sup> cells alone and PHA-stimulated T cells alone.

Table 6. Effects of PHA-stimulated T cells and fractionated T4<sup>+</sup> cells from healthy volunteers on growth of blood BFU-E from three patients in remission and one transfusion-dependent patient.

Patient	Nonadherent T-depleted (NA T <sup>-</sup> ) cells alone from the patients (BFU-E source)	T cells alone from normal blood	NA T <sup>-</sup> cells from the patients plus T cells from normal blood	NA T <sup>-</sup> cells from the patients plus T4 <sup>+</sup> cells from normal blood
	(BFU-E/2.5 × 10 <sup>5</sup> )	(BFU-E/1.25 × 10 <sup>5</sup> )	( BFU-E / 3.75 × 10 <sup>5</sup> )	
2.	3 ± 2	3 ± 1	12 ± 2** (2.00)	—
3.#	4 ± 1	3 ± 2	21 ± 1* (3.00)	—
4.	8 ± 2	2 ± 1	17 ± 3** (1.70)	16 ± 3** (1.60)
5.	4 ± 0	—	—	—
6.	6 ± 2	3 ± 0	19 ± 7** (2.11)	19 ± 5** (2.11)

The method of T4<sup>+</sup> cell separation and culture; see footnote in Table 5. # Patient 3 was transfusion-dependent. Data represent the mean number of BFU-E ± S.D. of triplicate cultures. The numbers in parenthesis are stimulation indices. \*p < 0.01, \*\*p < 0.05 compared with the calculated sum of BFU-E from NA T<sup>-</sup> cells alone plus PHA-stimulated T cells alone.

Table 7. Effects of cultured conditioned media from PHA-stimulated T cells and T4<sup>+</sup> cells from four patients in remission and one transfusion-dependent patient.

CM source	Nonadherent T-depleted (NA T <sup>-</sup> ) cells with PHA-P (0.1%)	CM added	
		PHA-TCM	PHA-T4CM
( BFU-E / 2.5 × 10 <sup>5</sup> )			
Patient 2.	20 ± 7	36 ± 0*	—
3.#	46 ± 6	36 ± 10	—
4.	10 ± 0	15 ± 1**	21 ± 1***
5.	30 ± 2	80 ± 10**	—
6.	14 ± 2	26 ± 3**	40 ± 0***

The method of T4<sup>+</sup> cell separation and culture; see footnote in Table 2.

# Patient 3 was transfusion-dependent.

\*p < 0.02, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 compared with BFU-E from NA T<sup>-</sup> cells with 0.1% PHA-P.

## 考 察

T細胞による末梢血 BFU-E 調節に関して多くの報告が見られるが<sup>14)~17)</sup>, 近年モノクローナル抗体の利用で, T細胞サブセットによる赤血球造血のメカニズムが明らかになって来ている<sup>30)~32)</sup>.

Mangan ら<sup>30)</sup>は, IgG 標識ウシ赤血球との結合能で T $\mu$  細胞, T $\gamma$  細胞, T-non- $\gamma$  細胞を分離し, レクチン無添加で自己末梢血 BFU-E への作用を検討しているが, 各々の細胞分画の赤血球系幹細胞増殖刺激活性の差は各分画中の OKT4 陽性細胞の比率に比例すると報告している. また, Wisniewski ら<sup>31)</sup>も同様に, 自己末梢血 BFU-E への T細胞の作用を検討している. 彼らは, OKT4 陽性細胞, OKT8 陽性細胞共に BPF 産生細胞であるとしている. いずれの報告もレクチン無添加での T細胞サブセットの影響を検討しており, また各細胞分画の培養上清の BPF 活性の有無については検討されていない.

今回の著者らの検討では, PHA 刺激系においては T4<sup>+</sup> 細胞が BPF 産生細胞であり, その培養上清中にも BPF 活性が存在していることを示した. Kanz ら<sup>33)</sup>も PHA 刺激 T4<sup>+</sup> 細胞上清の骨髓多能性幹細胞, 巨核球系幹細胞および赤血球系幹細胞への増殖作用を報告しており, BFU-E への作用に関しては著者の報告と一致している. 末梢血 BFU-E は骨髓 BFU-E に比しより未熟な段階に属すると言われており<sup>34)35)</sup>, PHA 刺激 T4<sup>+</sup> 細胞上清中の BPF は CFU-E 以前の赤血球系幹細胞に全汎的に作用する可能性があると考えられた.

また, OKT4<sup>+</sup> の悪性リンパ腫および白血病細胞も PHA 刺激で BPF を産生する能力を有しているようである<sup>36)</sup>.

BPF は Epo に比し, より熱安定性であると言われてしている<sup>37)38)</sup>. 著者の検討では, PHA 刺激 T4<sup>+</sup> 細胞由来の BPF は 100°C 10 分以上の熱処理で失活しており, この結果は Porter ら<sup>37)</sup>の報告する骨髓細胞由来の BPF と同様の熱耐性を有していると考えられた. 骨髓細胞由来の BPF も, 著者の検討と同様に 1 個のバースト当りの細胞数の増加およびヘモグロビン合成能の促進を示す.

CHA における赤血球造血障害の原因として, (1)赤血球系幹細胞の量的あるいは質的異常 (例えば, Epo や BPF への反応性低下)<sup>7)8)13)</sup>, (2)赤血球造血を維持する骨髓微少環境の異常<sup>11)</sup>, (3)赤血球造血に関与する補助細胞の異常 (例えば, 幹細胞障害性リンパ球の存在)<sup>3)4)28)</sup>が仮定されている. 今回の著者の検討では, Hoffman ら<sup>3)</sup>や Steinberg ら<sup>4)</sup>によって報告されている細胞障害性リンパ球の存在は証明されなかった.むしろ, active stage 4 例および transfusion-dependent stage 2 例において T細胞 (特に T4<sup>+</sup> 細胞) の BPF 産生能に障害が認められた. しかし, ステロイド剤に反応し完全寛解となった後は, この様な T4<sup>+</sup> 細胞の BPF 産生障害は回復した. 完全寛解例全例で, T細胞あるいは T4<sup>+</sup> 細胞培養上清中に BPF 活性が見い出され, また transfusion-dependent 例では T細胞培養上清中に BPF 活性は証明されなかった. これらの結果から, CHA では active stage の末梢血 T4<sup>+</sup> 細胞の

BPF 産生能に障害があるが、ステロイド反応例では血液学的寛解に伴い回復する。しかし、ステロイド不応例ではこの障害が持続していると考えられた。また、完全寛解後の患児末梢血 BFU-E は自己 T 細胞 (特に T4<sup>+</sup> 細胞) の BPF 産生能の回復にもかかわらず低値であること、正常 T 細胞 (あるいは T4<sup>+</sup> 細胞) 添加にても形成されるコロニー数が低値であることから、赤血球系幹細胞自体の内的障害 (BPF 反応性低下) も残存している可能性も示唆された。

Nathan ら<sup>29)</sup>は、血漿凝固法を用いて 3 例の CHA で T 細胞の null 細胞 (非付着非 T 非 B 細胞) 由来の末梢血 BFU-E への影響を検討し、正常 T 細胞と同程度の BFU-E 刺激作用を認めたことから、T 細胞のヘルパー能は正常との報告をしている。彼らの結果は著者の結果と相反するものである。しかし、彼らの対象とした 3 例の CHA 患者は全例がステロイド剤服用中で、臨床的に貧血の改善を認めていた。ステロイド剤は *in vitro* において赤血球系幹細胞の Epo への感受性を高めること<sup>7,9,10)</sup>、また著者の検討では、症例 3 (ステロイド不応例) の T 細胞も、PHA とハイドロコチゾン (10<sup>-4</sup> M) 存在下で培養した場合 BFU-E 形成を対照の 150% にまで増加させる (精しいデータは省略) こと、すなわち、ステロイドは T 細胞の BPF 産生能を高める可能性があることから、彼らの結果はステロイド剤にて修飾された T 細胞機能を見ているものと考えられ、真の T 細胞機能を反映していないと思われた。

末梢血 T 細胞サブセットに関して、今回検討した 6 例中 3 例において、active stage では T4/T8 比の逆転が見られ完全寛解後も正常化していなかった。さらに症例 2 は、診断時には正常範囲内であった T4/T8 比が完全寛解後逆転した。Finlay ら<sup>29)</sup>は 5 例の CHA で末梢血 T 細胞サブセットの検討を行い、T4/T8 比の減少を報告している。彼らは全例で末梢血リンパ球のレクチン反応性の低下を証明しているが、1 例にのみ T 細胞による赤血球系前駆細胞 (CFU-E) の抑制を認めている。著者も、T4/T8 比の異常を認めない症例 1 および 3 でも T4<sup>+</sup> 細胞による BPF 産生障害を認めており、末梢血 T 細胞サブセットの比率とその赤血球系幹細胞調節機能とに直接的関連がないと考えられた。

## 結 論

T 細胞による正常ヒト末梢血赤血球系幹細胞の分化増殖調節機構を明らかにし、さらに先天性赤芽球癆における赤血球造血障害のメカニズムに関して検討を行った。その結果、以下の結論を得た。

### I. 正常ヒト末梢血 BFU-E 調節に関して

1. PHA 刺激系では、T4<sup>+</sup> 細胞が末梢血 BFU-E 増加作用を示した。

2. PHA 刺激 T4<sup>+</sup> 細胞は BPF 産生することで、間接的に BFU-E に作用すると考えられた。

3. PHA 刺激 T4<sup>+</sup> 細胞由来の BPF は、BFU-E コロニー数の増加のみならず 1 個のコロニー当りの細胞数の増加およびヘモグロビン合成促進作用も有していた。また、BPF 活性は 100°C 10 分以上の熱処理で失活した。

### II. 先天性赤芽球癆の赤血球造血障害に関して

1. CHA 6 例中 5 例で末梢血単核細胞、3 例で T 細胞および T8<sup>+</sup> 細胞の正常骨髄 CFU-E への影響を検討したが、CFU-E 障害性リンパ球の存在は認めなかった。

2. CHA は、active stage では PHA 刺激 T4<sup>+</sup> 細胞の BPF 産生能に障害が見られた。

3. ステロイド反応例では、T4<sup>+</sup> 細胞の BPF 産生障害は完全寛解後回復したが、ステロイド不応例では BPF 産生障害は持続していた。

4. 完全寛解後も CHA 末梢血 BFU-E 数は低値で、正常 T4<sup>+</sup> 細胞の添加にても形成されるコロニー数は低値であり、BFU-E 自体の内的障害 (BPF 反応性低下) も残存している可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師谷口昂教授に深く感謝の意を表します。また、御指導と御進言を頂きました小泉晶一講師はじめ小児科学教室血液グループの諸先生方に感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨は第 24 回日本小児血液研究会、第 46 回と第 49 回日本血液学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) Diamond, L. K., Allen, D. M. & Magill, F. B.: Congenital (Erythroid) hypoplastic anemia. *Amer. J. Dis. Child.*, 102, 149-161 (1961).
- 2) Diamond, L. K., Wang, W. C. & Alter, B. P.: Congenital hypoplastic anemia. *Adv. Pediatr.*, 22, 349-356 (1976).
- 3) Hoffman, R., Zanjani, E. D., Zalusky, P., Lutton, J. D., & Wasserman, C. R.: Diamond-Blackfan syndrome. Lymphocyte-mediated suppression of erythropoiesis. *Science*, 19, 889-890 (1976).
- 4) Steinberg, M. H., Coleman, M. F. & Pennebaker, J. B.: Diamond-Blackfan syndrome. Evidence of T-cell mediated suppression of erythroid development and a serum blocking factor

associated with remission. *Br. J. Haematol.*, **41**, 57-68 (1979).

- 5) Nathan, D. G., Clarke, B. J., Hillman, D. G., Alter, B. P. & Housman, D. E.: Erythroid precursors in congenital hypoplastic (Diamond-Blackfan) anemia. *J. Clin. Invest.*, **61**, 489-498 (1978).
- 6) Freedman, M. H. & Saunders, E. F.: Diamond-Blackfan syndrome. Evidence against cell-mediated erythropoietic suppression. *Blood*, **51**, 1125-1128 (1978).
- 7) Alter, B. P.: Childhood red cell aplasia. *Amer. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, **2**, 121-139 (1980).
- 8) Lipton, M. J., Kudisch, M., Gross, R. & Nathan, D. G.: Defective erythroid progenitor differentiation system in congenital hypoplastic (Diamond-Blackfan) anemia. *Blood*, **67**, 962-968 (1986).
- 9) Chan, H. S., Saunders, E. F. & Freedman, M. H.: Diamond-Blackfan syndrome. I. Erythropoiesis in prednisone responsive and resistant disease. *Pediatr. Res.*, **16**, 474-476 (1982).
- 10) Chan, H. S., Saunders, E. F. & Freedman, M. H.: Diamond-Blackfan syndrome. II. In vitro corticosteroid effect on erythropoiesis. *Pediatr. Res.*, **16**, 477-450 (1982).
- 11) Ershler, W. B., Ross, J., Finlay, J. L. & Shahidi, N. T.: Bone marrow microenvironment defect in congenital hypoplastic anemia. *N. Eng. J. Med.*, **303**, 1321-1327 (1980).
- 12) Geller, G., Krivit, W., Zalusky, R. & Zanjani, E. D.: Lack of erythropoietic inhibitor effect of serum from patients with congenital pure red cell aplasia. *J. Pediatr.*, **86**, 198-201 (1975).
- 13) Freedman, M. N., Amato, D. & Saunders, E. F.: Erythroid colony growth in congenital hypoplastic anemia. *J. Clin. Invest.*, **57**, 673-677 (1967).
- 14) Nathan, D. G., Chess, L., Hillman, D. G., Clarke, B., Breard, J., Merler, E. & Housman, D. E.: Human erythroid burst-promoting unit. T-cell requirement for proliferation in vitro. *J. Exp. Med.*, **147**, 324-339 (1978).
- 15) Clarke, B. J., Harvey, A. R., Kaiser, J. & Leeds, C.: Quantitative analysis of the role of accessory cells in the development of human blood BFU-E derived colonies. *Exp. Hematol.*, **12**, 259-265 (1984).
- 16) Golde, D. W., Bersch, N., Quan, S. G. & Lusis, A. J.: Production of erythroid-potentiating activity by a human T-lymphoblast cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 593-596 (1980).
- 17) Mangan, K. F. & Desforjes, J. F.: The role of T lymphocytes and monocytes in the regulation of human erythropoietic peripheral blood burst forming units. *Exp. Hematol.*, **8**, 717-727 (1980).
- 18) Banisadre, M., Ash, R. C., Ascensao, J. L., Kay, N. E. & Zanjani, E. D.: Suppression of erythropoiesis by mitogen activated T lymphocytes in vitro. *Exp. Hematol. Today*, p.151. S. Karger, Basel, New York, 1981.
- 19) Zuckerman, K. S.: Human erythroid burst-forming units. Growth in vitro is dependent on monocytes, but not T lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, **67**, 702-709 (1981).
- 20) Grill, G. & Carbonell, F.: Effect of blood derived monocytes on the promotion of in vitro erythropoietic colony growth in human bone marrow cultures. *Scand. J. Haematol.*, **29**, 345-349 (1982).
- 21) Reid, C. D. L., Baptista, L. C. & Chanarin, L.: Erythroid colony growth in vitro from human peripheral blood null cells. Evidence for regulation by T-lymphocytes and monocytes. *Br. J. Haematol.*, **48**, 155-159 (1981).
- 22) Wahl, S. M., Rosenstreich, D. L. & Oppenheim, J. J.: Separation of human leukocytes by E-rosette sedimentation. In B. R. Bloom & J. R. David (eds), *In vitro methods of cell mediated and tumor immunity*, 1st ed., p.231-235, Orlando, Fla, Academic, 1976.
- 23) Miyawaki, T., Taga, T., Nagaoki, T., Seki, H., Suzuki, Y. & Taniguchi, N.: Circadian changes of T lymphocytes in human peripheral blood. *Clin. Exp. Immunol.*, **55**, 618-622 (1984).
- 24) Koizumi, S., Yamagami, M., Horita, S., Miura, M., Sano, M., Ikuta, N. & Taniguchi, N.: Effects of OKT3<sup>+</sup>, OKT4<sup>+</sup> and OKT8<sup>+</sup> T cell subsets on steady-state granulopoiesis in vitro. *Int. J. Cell. Clon.*, **1**, 130-141 (1983).
- 25) 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.*, **4**, 1314-1317 (1981).

- 26) **Iscove, N. N., Sieber, F. & Winterhalter, K. H.**: Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow. Analysis of the requirement of erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A. *J. Cell. Physiol.*, **83**, 309-316 (1974).
- 27) **Tepperman, A. D., Curtis, J. E. & McCulloch, E. A.**: Erythropoietic colonies in cultures of human marrow *Blood*, **44**, 659-669 (1974).
- 28) **Finlay, J. L., Shahidi, N. T. & Horowitz, S.**: Lymphocyte dysfunction in congenital hypoplastic anemia. *J. Clin. Invest.*, **70**, 619-626 (1982).
- 29) **Nathan, D. G., Hillman, D. G., Chess, L., Alter, B. P., Clarke, B. J., Breard, J. & Housman, D. E.**: Normal erythropoietic helper T cells in congenital hypoplastic (Diamond-Blackfan) anemia. *N. Eng. J. Med.*, **298**, 1049-1051 (1978).
- 30) **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).
- 31) **Wisniewski, D., Strife, A., Wachter, M. & Clarkson, B.**: Regulation of human peripheral blood erythroid burts-forming unit growth by T lymphocytes and T lymphocyte subpopulations defined by OKT4 and OKT8 monoclonal antibodies. *Blood*, **65**, 456-463 (1985).
- 32) **Harada, M., Nakao, S., Kondo, K., Odaka, K., Ueda, K., Shiobara, S., Matsue, K., Mori, T. & Matsuda, T.**: Effect of activated lymphocytes on the regulation of hematopoiesis. Enhancement and suppression of in vitro BFU-E growth by T cells stimulated by autologous non-Tcells. *Blood*, **67**, 1143-1147 (1986).
- 33) **Kanz, L., Löhr, G. W. & Fauser, A. A.**: Lymphokine(s) from isolated T lymphocyte subpopulations support multilineage hematopoietic colony and megakaryocytic colony formation. *Blood*, **68**, 991-995 (1986).
- 34) **Lipton, J. M., Reinherz, E. L., Kudisch, M., Jackson, P. L., Schlossman, S.F. & Nathan, D. G.**: Mature bone marrow erythroid burst-forming units do not require T cells for induction of erythropoietin dependent differentiation. *J. Exp. Med.*, **152**, 350-360 (1980).
- 35) **Ogawa, M., Grush, O. C., O'Dell, R. F., Hara, H. & MacEachern, M. D.**: Circulating erythropoietic precursors assessed in culture. Characterization in normal men and patients with hemoglobinopathies. *Blood*, **50**, 1081-1092 (1977).
- 36) **Froom, P., Ramot, B., Biniaminov, M. & Douer, D.**: Production of burst-promoting activity by monoclonal antibody defined malignant T lymphocytes from patients with lymphocytic leukemia and lymphoma. *Blood*, **65**, 997-1001 (1985).
- 37) **Porter, P. N. & Ogawa, M.**: Characterization of human erythroid burst-forming activity derived from bone marrow conditioned media. *Blood*, **59**, 1207-1212 (1982).
- 38) **Ascensao, J. L., Kay, N. E., Earenfight-Engler, T., Koren, H. S. & Zanjani, E. D.**: Production of erythroid potentiating factor(s) by a human monocytic cell line. *Blood*, **57**, 170-173 (1981).

**Regulatory Roles of PHA-stimulated T-cell Subsets on Erythroid Burst-Forming Units (BFU-E) Growth in Healthy Individuals and in Patients with Congenital Hypoplastic Anemia (CHA): Functional Impairment of T4<sup>+</sup> Lymphocytes in the Active Stage of CHA.** Seiki Horita, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **96**, 693—705 (1987)

**Key words:** erythroid burst-forming units, burst-promoting factor, congenital hypoplastic anemia, PHA-stimulated T4<sup>+</sup> cell

#### Abstract

To clarify the mechanisms of impaired erythropoiesis of congenital hypoplastic anemia (CHA), PHA-stimulated T-cell subsets from both healthy volunteers and six patients at various stages of disease were evaluated for their ability to support *in vitro* growth of erythroid burst-forming units (BFU-E). Plastic nonadherent (NA) cells, T cells, T4<sup>+</sup> cell-enriched populations and T8<sup>+</sup> cell-enriched populations were stimulated with phytohemagglutinin (1.0% PHA-P) for 20 hours and their growth-promoting activity was estimated by the *in vitro* BFU-E assay system, in which T cell-depleted NA cells were usually used as BFU-E sources. To assess the production of burst-promoting factor (s), cultured conditioned media (CM) of PHA-stimulated T-cell subsets in place of cells were added to the BFU-E assay system to a final concentration of 10% (v/v). PHA-stimulated NA cells, T cells, and T4<sup>+</sup> cells from healthy controls significantly augmented BFU-E colony growth, and CM from T and T4<sup>+</sup> cells, but not T8<sup>+</sup> cells, also enhanced BFU-E growth. Burst-promoting factor (s) from these T-cell subsets also increased not only the number of BFU-E, but also hemoglobinization of each colony and the number of cells in it. In contrast, PHA-stimulated T4<sup>+</sup> cells from three patients with CHA in the active stage and two patients at the transfusion-dependent stage did not appreciably stimulate BFU-E growth. After remission with corticosteroid, T or T4<sup>+</sup> cells from two of four patients exerted significant enhancing effects. CM of PHA-stimulated T or T4<sup>+</sup> cells from all patients in remission, not from transfusion-dependent patients, also significantly enhanced BFU-E growth. These data indicate that T4<sup>+</sup> cells in the active stage of CHA are defective in their ability to support BFU-E growth, but the functional aberration might be reversible, at least in some patients, with clinical improvement. The reduced amount of BFU-E growth in patients in remission even with the help of normal T4<sup>+</sup> cells, however, may suggest the persistence of some intrinsic defect in BFU-E in this disorder.