

The Cell Mediated Cytotoxicity of Peripheral Lymphocytes in Human Newborn

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/2297/7932

新生児リンパ球の細胞傷害能に関する研究

—抗 CD3 誘導性細胞傷害能を中心に—

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

松 田 明

(昭和62年2月5日受付)

臍帯血リンパ球を用い、新生児期の細胞傷害活性、特に抗 CD3 誘導性細胞傷害能 (anti-CD3 induced cytotoxicity) の特異性について検討した。臍帯血リンパ球のナチュラルキラー (natural killer, NK) 活性は成人リンパ球に比し低いが、組換えインターロイキン-2 (recombinant interleukin-2, rIL-2) にて成人レベルにまで増強された。リンホカイン活性化キラー (lymphokine-activated killer, LAK) 活性は成人では 26% 誘導されるのに対し、臍帯血では 15% 程度しか誘導されなかった。抗 CD3 誘導性細胞傷害能は NK 感受性細胞である K562 と NK 非感受性細胞である HL60 を標的細胞として測定した。K562 に対して臍帯血では 20% 近くの NK 活性の増強がみられたが、成人に比し弱い誘導であった。HL60 に対しては成人では 30% 以上の強い誘導が認められたが、臍帯血ではほとんど誘導されなかった。臍帯血では抗 CD3 抗体でインターフェロン- γ (interferon- γ , IFN- γ) は産生されないが、IL-2 は成人と同程度に産生が認められるため、抗 CD3 抗体と同時に抗 IL-2 中和抗体を添加し IL-2 依存性細胞傷害活性を除くと、K562 や HL60 に対する細胞傷害能の増強はみられなかった。以上より、臍帯血では真の意味での抗 CD3 誘導性細胞傷害能の誘導は極めて低いものと考えられた。年齢別に抗 CD3 誘導性細胞傷害能と Leu 7, Leu 11 陽性細胞の比率を検討したところ、Leu 11 陽性細胞は年齢によってほとんど変化はなかったが、Leu 7 陽性細胞は 1 歳頃までほとんど検出されず、また、抗 CD3 誘導性細胞傷害能も誘導されなかった。年齢とともに Leu 7 陽性細胞が徐々に増加するにつれて抗 CD3 誘導性細胞傷害能も増強された。以上より、抗 CD3 誘導性細胞傷害能と Leu 7 陽性細胞の出現度に関係があることが示唆されたが、その詳細については今後に残された課題である。

Key words natural killer, lymphokine-activated killer, non-specific cytotoxicity, anti-CD3-induced cytotoxicity, Leu 7⁺ cells

免疫機構の中でも生体防禦の中心となる細胞障害活性について近年さかんに研究されている。中でも抗原認識を介さないナチュラルキラー (natural killer, NK) 活性^{1)~4)}やリンホカイン活性化キラー (lymphokine-activated killer, LAK) 活性^{5)~9)}は、腫瘍免疫、ウイルス感染防禦機構などを知る上で重要である。細胞傷害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) による抗原特異的 CTL (antigen-specific CTL) 活性^{10)~11)}は、抗原認識後の中心をなす細胞傷害機構と考えられるが、最近、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) に関係せず抗 CD3 抗体 (OKT3 あるいは Leu 4) により

誘導される non-MHC-restricted CTL^{12)~17)}の存在が報告されており、NK 細胞と同様にウイルス感染などに対する一次的な生体防禦機構をなすと考えられる。

CD3 は成熟 T 細胞の表面マーカーであるが、抗 CD3 抗体は主に次の作用をもっている。1) T 細胞の活性化と増殖¹⁸⁾、2) 混合リンパ球培養 (mixed lymphocyte culture, MLC) によって誘導される抗原特異的 CTL 活性の抑制^{19)~21)}、3) non-MHC-restricted cytotoxicity の誘導である。CD3 は T 細胞レセプターと複合体 (CD3/Ti 複合体) を作り、抗 CD3 抗体は直接的に T 細胞を活性化させると考えられている²²⁾²³⁾。しかし、non-MHC-restricted CTL について

Abbreviations: CTL, cytotoxic T lymphocyte; ³H-TdR, tritiated thymidine; LAK, lymphokine-activated killer; MHC, major histocompatibility complex; MLC, mixed lymphocyte culture; NK, natural killer; PHA, phytohemagglutinin; rIL-2, recombinant interleukin-2; rIFN- γ , recombinant interferon- γ ; LGL, large granular lymphocyte.

のメカニズムはまだ明らかではない。

新生児期の細胞傷害活性についてはさまざまな研究がなされている。臍帯血リンパ球には、成人に比し低い明らかなNK活性が認められ、組換えインターロイキン-2 (recombinant interleukin-2, rIL-2) 刺激により著明に活性の増強がみられる²³⁾。rIL-2 刺激による活性の増強はNK活性のほとんどない胎生期より認められる²⁾。新生児期の non-MHC-restricted CTL 活性について検討した報告はないが、新生児期の感染防禦機構を知る上で重要であると思われる。今回、抗CD3 誘導性細胞傷害能について、臍帯血および小児のリンパ球で検討し、同時にNK活性、LAK活性等と比較して、その特徴について検討した。

対象および方法

I. 対 象

臍帯血は満期正常分娩児の臍帯よりヘパリン加採血して得た。また、乳児より13歳までの小児および24~36歳までの成人健康男子よりヘパリン加静脈血を得た。

II. リンパ球の分離

ヘパリン加静脈血から、Ficoll-Hypaque Lymphoprep (Nyegaard & Co., Oslo, Norway) を用いた比重遠心法²⁴⁾により単核細胞を採取した。それをペニシリン (200 u/ml)、ゲンタマイシン (10 μg/ml)、0.02 M Hepes 緩衝液 (GIBCO, Grand Island, N.Y.)、10% 非動化ウシ胎児血清 (heat-inactivated fetal calf serum, FCS) を含む RPMI 1640 培養液 (GIBCO) に再浮遊し、プラスチックシャーレ (No.3002) (Falcon Plastics, Oxnard, C.A.) を用いて付着細胞の単球を除去し、非付着細胞をリンパ球として以下の実験に使用した。

III. モノクローナル抗体によるリンパ球亜群 Leu 7, Leu 11 の測定

各年齢層のリンパ球について、NK 関連抗体であるフルオレセイン・イソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識モノクローナル抗体 Leu 7 あるいは Leu 11 (Becton-Dickinson, Mountain View, C.A.) をレーザーフローサイトメーター-Spectrum III (Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, N.J.) を用いて解析した²⁵⁾。

IV. 培養条件

リンパ球は10% FCS 添加 RPMI 1640 培養液にて 2×10^6 /ml に調節し、96穴丸底マイクロプレート (No.25850) (Corning Glass Works, Corning, N.Y.) に0.1 ml ずつ分注し、炭酸ガス培養器 (37°C, 5% CO₂) 内にて培養した。NK 活性及び抗CD3 誘導性細胞傷害能は24時間、LAK 活性は3日間培養し、エ

フェクター細胞とした。細胞傷害活性誘導因子として、rIL-2 (武田薬品, 大阪) (150 u/ml), OKT3 モノクローナル抗体 (Ortho Diagnostic Systems Inc.) (50 ng/ml), 組換えインターフェロン-γ (recombinant interferon-γ) (協和発酵, 東京) (500 u/ml), 及びフィトヘムアグルチニン (phytohemagglutinin, PHA) (DIFCO, Detroit, M.I.) (0.1%) を培養直前に添加した。

また、一部の培養系においてIL-2 活性を中和しIL-2 依存性細胞傷害能を除く目的で、抗IL-2 モノクローナル抗体 (L61 抗体) (塩野義製薬, 大阪) (2.5 μg/ml) を同時に添加した。

V. 細胞傷害活性の測定

傷害活性の標的細胞としてNK感受性細胞であるK562 (ヒト赤白血病由来), NK非感受性細胞であるHL60 (ヒト急性前骨髄球性白血病由来), BALL-1 (ヒトB細胞白血病由来), 及びKBL (ヒトB細胞リンパ腫由来) を用いた。細胞傷害活性測定はWestらの方法²⁶⁾に準じて、4時間培養⁵¹Cr-release assay法にて行なった。各標的細胞をNa⁵¹CrO₄ (New England Nuclear, Boston, M.A.) でラベルした後、培養液で 1×10^6 /ml に調節し、前述したエフェクター細胞 (2×10^6 /ml, 0.1 ml) の入ったマイクロプレートに等量ずつ添加し、エフェクター細胞: 標的細胞比を20:1とした。25×G, 5分間遠心後、37°C, 5% CO₂ 下で4時間培養し、その上清中⁵¹Cr放出量をガンマシンチレーションカウンターARC-501 (アロカ, 東京) で測定した。%細胞傷害能は以下の式で算出した。

$$\% \text{Cr specific release} (\%) = \frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximum release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

maximum release は1% Triton X0.1 ml を標的細胞0.1 ml に添加したときの最大⁵¹Cr放出量を、spontaneous release は培養液を添加したときの⁵¹Cr自然放出量を示した。

VI. DNA 合成能の測定

リンパ球 1×10^6 コを10% FCS 添加 RPMI 1640 培養液に浮遊し、OKT3 (50 ng/ml) あるいはPHA (0.1%) を添加し、72時間培養した。培養終了24時間前に³H 標識チミジン (tritiated thymidine, ³H-TdR) (New England Nuclear) を0.2 μCi 添加し、液体シンチレーションカウンターLSC-700 (アロカ) にて³H-TdR のとりこみを測定した²⁷⁾。

VII. IL-2, IFN-γ 産生能の測定

1×10^6 /ml のリンパ球をOKT3 あるいはPHAで24時間刺激し、培養上清のIL-2, IFN-γ 活性を測定した。IL-2 活性はIL-2 依存性細胞であるCTLL-2 (マウ

スT細胞由来)を用いて Gillis らの方法²⁸⁾で測定した。すなわち、培養上清 0.1 ml を 96 穴マイクロプレート上で 10% FCS 添加 RPMI 1640 培養液により 2 倍段階希釈し、CTLL-2 (4×10^4 /ml) を等量づつ加え、24 時間培養後 $^3\text{H}\cdot\text{TdR}$ のとりこみを測定した。

IFN- γ 活性はヒト羊膜由来の FL 細胞と Sindbis virus を用いた 50% 細胞変性阻止法により測定した²⁹⁾。すなわち、96 穴平底マイクロプレート (No. 25860) (Corning) に培養上清の 2 倍希釈系列を作成し、FL 細胞 (3×10^6 /ml) を各穴に分注した。24 時間培養後、1% クリスタルバイオレット液 (和光純薬、大阪) により染色し、FL 細胞変性阻止が得られる希釈倍数の逆数をもって IFN- γ 活性とした。

成 績

I. NK 活性 (図 1, A)

K562 に対する NK 活性は成人末梢血リンパ球が 40% であるのに対し、臍帯血リンパ球では 20% で約半分の活性であった。しかし、rIL-2 添加による NK 活性の増強は、成人の 65% に対し、臍帯血も 60% 近くまで増強された。

II. LAK 活性 (図 2)

LAK 活性は rIL-2 添加 3 日培養後の HL60 に対する細胞傷害活性で示した。臍帯血の LAK 活性は約 15% であり、成人の 2/3 程度の活性であった。rIL-2 と rIFN- γ を同時に添加しても、臍帯血では 20% 近くまでしか誘導されず、成人レベルまでは達しなかった。

III. 抗 CD 3 誘導性細胞傷害能 (図 1, A, B)

OKT3 刺激 24 時間培養リンパ球の K562 に対する

細胞傷害活性は、成人では rIL-2 刺激時と同程度の 70% 近くまで増強されるが、臍帯血では 40% 近くまでしか増強されなかった。一方、HL60 に対する細胞傷害活性は、成人では rIL-2 刺激時より強い 35% 近い誘導がみられるのに対し、臍帯血では 3% でほとんど誘導がみられなかった。

IV. PHA induced cytotoxicity (図 1, A, B)

PHA 刺激により K562 に対する細胞傷害活性は臍帯血で 40% 近くに、成人では 50% 近くに増強した。HL60 に対しては、臍帯血では約 9% の誘導がみられ、成人では 26% まで誘導された。

V. 抗 CD 3 誘導性細胞傷害能の Kinetics

抗 CD 3 抗体により誘導される傷害活性を検討するために、24 時間及び 3 日培養後の HL60 に対する傷害活性を測定し、LAK 活性の誘導と比較した (図 3)。成人では rIL-2 添加により徐々に LAK 活性が誘導されているのに対し、OKT3 添加による傷害活性は 24 時間でピークとなり、3 日目でもほとんど活性は変わらなかった。臍帯血リンパ球では、rIL-2 添加による傷害活性は弱いが増加し、3 日目でも 20% 近くまで誘導されるのに対し、OKT3 添加では 24 時間でほとんど誘導は認められず、3 日目でも 10% 程度しか誘導されなかった。

次に、OKT3 による誘導を添加量を変えて比較した (図 4)。K562 に対し、成人では 0.04 ng/ml から誘導がみられるが、臍帯血では 5 ng/ml 刺激で初めて誘導された。一方、HL60 では、成人は OKT3 の添加量を増すにつれて活性が増加したが、臍帯血では添加量を増やしてもわずかな誘導しかみられなかった。

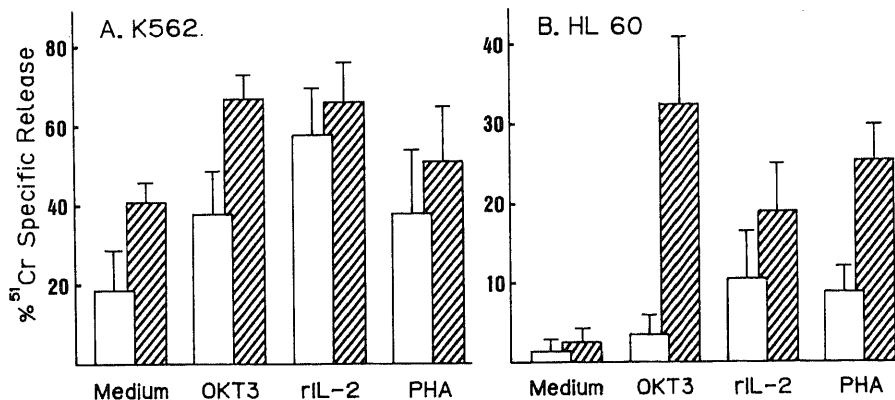


Fig. 1. Cell-mediated cytotoxicity of cord and adult peripheral blood lymphocyte (PBL).

PBL (2×10^6 /ml) from cord blood (open column) and healthy adult (shaded column) were cultured for 24 hr in the absence or the presence of OKT3 (50 ng/ml), rIL-2 (150 u/ml), or PHA (0.1%). ^{51}Cr -labeled target cells (A, K562; B, HL60) were added to cultures at E: T ratio of 20: 1. Cells were incubated for 4 hr and cytotoxicity was determined. Data represent the mean percent \pm SD of ten separate experiments.

VI. OKT3 刺激リンパ球の DNA 合成能及び IL-2, IFN- γ 産生能

臍帯血及び成人末梢血リンパ球の OKT3 刺激による DNA 合成能及び IL-2, IFN- γ 産生能を PHA 刺激と比較し検討した。

表 1 にみられるように, OKT3, PHA どちらの刺激に対しても, 臍帯血リンパ球は成人リンパ球と同程度の DNA 合成がみられた。結果は示していないが, 成人でも臍帯血でも OKT3 0.04 ng/ml 添加にてすでに $^3\text{H-TdR}$ のとりこみが認められた。

次に, IL-2 及び IFN- γ の産生能を測定した (表

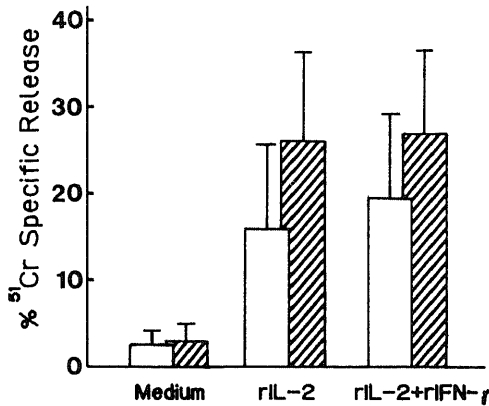


Fig. 2. Lymphokine-activated killer (LAK) cell activity against HL60.

PBL (2×10^6 /ml) from cord blood (open column) and adult (shaded column) were cultured with medium alone, rIL-2 (150 u/ml), or rIL-2 plus rIFN- γ (500 u/ml) for 3 days. Cytotoxicity against HL60 cells was tested in a 4 hr ^{51}Cr -specific release assay. Data are expressed as mean \pm SD of five separate experiments.

2). 成人では, OKT3, PHA 刺激共に, IL-2, IFN- γ を産生しているのに対し, 臍帯血では, IL-2 産生は認められるが, IFN- γ は OKT3 刺激でも PHA 刺激でもほとんど産生されなかった。

VII. 抗 IL-2 抗体による中和試験

OKT3 刺激により臍帯血でも IL-2 の産生が認められたため, 抗 CD 3 誘導性細胞傷害活性と IL-2 の関係を, 抗 IL-2 中和抗体を同時に添加して検討した (図 5)。成人では IL-2 刺激による K562 に対する傷害活性の増強は, 抗 IL-2 抗体添加により無刺激時の活性近くまで中和されたが, OKT3 による増強はほとんど変

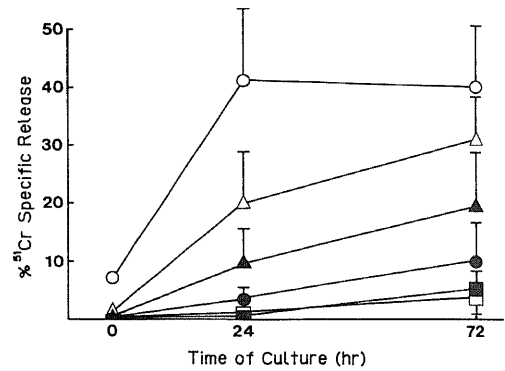


Fig. 3. Kinetics of anti-CD 3-induced cytotoxicity and LAK activity.

PBL (2×10^6 /ml) were cultured with medium alone ($\square-\square$, adult; $\blacksquare-\blacksquare$, cord blood), OKT3 (50 ng/ml) ($\circ-\circ$, adult; $\bullet-\bullet$, cord blood), or rIL-2 (150 u/ml) ($\Delta-\Delta$, adult; $\blacktriangle-\blacktriangle$, cord blood) for various time periods. Cytotoxicity against HL60 cells was tested in a 4 hr ^{51}Cr -specific release assay. The effector to target cell ratio was 20 : 1.

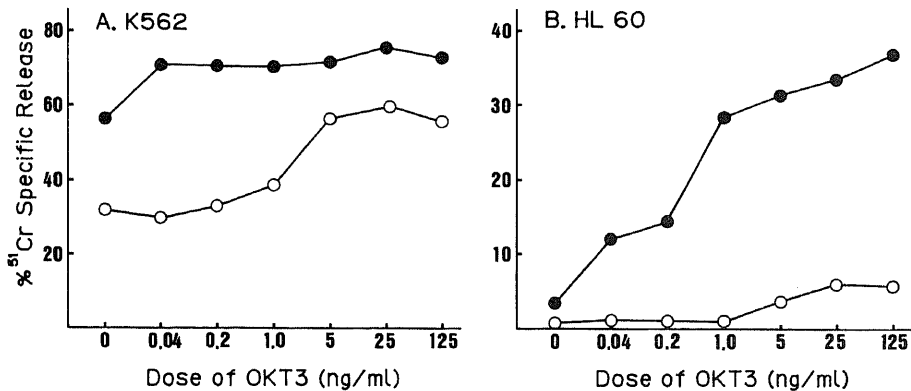


Fig. 4. Dose-response curve of anti-CD 3-induced cytotoxicity.

PBL (2×10^6 /ml) from adult ($\bullet-\bullet$) and cord blood ($\circ-\circ$) were incubated for 24 hr with various concentrations of OKT3 (0.04 to 125 ng/ml), and were evaluated for cytotoxicity against K562 (A) and HL60 (B). The effector to target cell ratio was 20 : 1. Similar results were obtained in two other experiments.

化しなかった。それに対し、臍帯血リンパ球は抗 IL-2 抗体添加により OKT3 刺激でも著明に低下し、無刺激時の活性にまで中和された。HL60 に対しても、成人では OKT3 による高い傷害活性は保たれたが、臍帯血では OKT3 によって誘導されたわずかな活性も消失した。

VIII. 他の標的細胞に対する傷害活性

NK 非感受性細胞である BALL-1, KBL を標的細胞として用い、同様の検索を行なった (図 6)。臍帯血リンパ球 (A) では rIL-2 による活性の高いものほど OKT3 による誘導も高くみられたが、抗 IL-2 抗体を添加することによって明らかに活性の低下がみられた。しかし、成人では OKT3 刺激による誘導は抗 IL-2 抗体を添加してもほとんど変化がみられなかった。

IX. 年齢別リンパ球の抗 CD 3 誘導性細胞傷害能の誘導と NK サブセットの変化

臍帯血および 2 カ月から成人までの各年齢毎の Leu 7 陽性細胞, Leu 11 陽性細胞の比率と抗 CD 3 誘導性細胞傷害能について検討した (表 3)。Leu 11 陽性細胞は臍帯血でも 13% 近くみられ、成人まであまり変化

しないのに対し、Leu 7 陽性細胞は臍帯血から 1 歳児末梢血まではほとんど認められず、以後徐々に増加し、成人では 20% 近く認められた。抗 CD 3 誘導性細胞傷害能についても、臍帯血から 1 歳児末梢血までは 2 ~ 3 % とほとんど活性は認められず、以後年齢とともに増加し、13 歳でほぼ成人に近い活性まで達した。

考 察

新生児期には種々のタイプの感染症に罹患しやすく、重症化することもよく知られている。その原因として、B 細胞の免疫グロブリン産生細胞への分化能、T 細胞の B 細胞分化調節能、リンホカイン産生能などの未熟性、NK 活性の低下など免疫機構の未熟性が上げられている^{2)3)29)~31)}。最近、抗原認識を介さない non-MHC-restricted CTL について報告されているが、新生児期の感染防禦を細胞傷害活性の点から研究するため、臍帯血の NK 活性、LAK 活性とともに抗 CD 3 誘導性細胞傷害能の特徴を検討した。

臍帯血の NK 活性は成人の 1/2 程度の活性しかな

Table 1. Proliferation of peripheral blood lymphocyte (PBL) from cord blood and adult

PBL		³ H-TdR Incorporation (CPM)		
		Medium	OKT3	PHA
Cord	1	1,282	18,323	17,839
Cord	2	2,886	15,590	14,173
Adult	1	681	14,381	23,449
Adult	2	1,667	12,882	24,609

PBL (10⁵ cells) were cultured for 3 days in microculture plates with medium alone, OKT3 (50 ng/ml), or PHA (0.1%). At 24 hr before harvest, 0.2 μCi ³H-TdR was added and the uptake of ³H-TdR was measured.

Table 2. IL-2 and IFN-γ production in PBL

PBL		IL-2 (CPM)*		IFN-γ (u/ml)**	
		OKT3	PHA	OKT3	PHA
cord blood	1	925	1,293	0	4
	2	11,495	614	0	4
	3	3,317	378	4	2
Adult	1	1,340	1,816	512	512
	2	8,119	2,240	1,024	1,024
	3	335	1,180	256	N.D.***

PBL (1×10⁶/ml) were cultured in the presence of OKT3 (50 ng/ml) or PHA (0.1%) for 24 hr, and culture supernatants were tested for IL-2 and IFN-γ activity.

*: Values of IL-2 were given as CPM of ³H-TdR uptake. Basal count was 270 CPM.

** : IFN-γ titers were assayed by antiviral activity.

*** : Not done.

かったが、rIL-2 刺激によって成人での増強と同レベルにまで増強した。臍帯血の LAK 活性も成人の 2/3 程度しか誘導されなかったが、その原因として、新生児期の IL-2 誘導性 IFN- γ 産生能の低下³¹⁾による可能性がある。しかし、rIL-2 と同時に rIFN- γ を添加してもほとんど LAK 活性の増強はみられず、これが LAK 活性低下の原因とは考えにくく、LAK 細胞の前駆細胞の未熟性のためと思われる。

OKT3 刺激では臍帯血では K562 に対する細胞傷害活性の 20% 近い増強がみられるのにもかかわらず、HL60 に対してはほとんど誘導がみられなかった。一方、OKT3 刺激による DNA 合成は臍帯血リンパ球も成人リンパ球と同程度認められ³²⁾、T 細胞の活性化に対し、臍帯血ではすでに十分な反応性をもっていることがわかった。また、OKT3 により T 細胞は IL-2 や IFN- γ のようなリンホカインを産生するが³³⁾⁻³⁵⁾、臍帯血では IL-2 は成人と同程度産生されるにもかかわらず、IFN- γ はほとんど産生していなかった³²⁾。よって、OKT3 に対する活性の誘導がみられない原因とし

て、IFN- γ 産生の不良による可能性も考えられるが、臍帯血においては OKT3 とともに IFN- γ を添加しても増強されなかった。

臍帯血でも抗 CD3 抗体により IL-2 は産生されることから、この影響をなくすために抗 IL-2 中和抗体を同時に添加したところ、成人対照ではほとんど変化しなかったが、臍帯血では K562 に対する増強も HL60 に対するわずかな誘導もほとんど消失した。標的細胞を変えて測定しても同様の結果が得られた。成人でも抗 CD3 抗体により IL-2 の産生が認められるが、抗 IL-2 抗体を添加しておいても抗 CD3 誘導性細胞傷害能はほとんど変化なく高い活性が認められ、抗 CD3 抗体の直接作用と考えられた。

同じく T 細胞を活性化させる分裂促進因子 (mitogen) である PHA も lectin-dependent cell-mediated cytotoxicity (LDCC) を誘導する³⁶⁾が、臍帯血では成人よりも弱いが誘導がみられ、結果は示していないが抗 IL-2 抗体での抑制はみられず、抗 CD3 誘導性細胞傷害能とは異なる機序であると考えられる。

以上より、臍帯血にみられた抗 CD3 抗体による傷害活性の大部分は IL-2 依存性であり真の意味での抗 CD3 誘導性細胞傷害能はほとんど誘導されないと考えられ、原因として前駆細胞の減少または未熟性が考えられる。

NK 活性や LAK 活性の担当細胞は Leu 11 (CD 16) 陽性細胞であるが³⁷⁾、ほとんど CD3 陰性であり³⁸⁾³⁹⁾、また、Reynold ら⁴⁰⁾も遺伝子の再編成と mRNA 発現の検索から NK 細胞が T 細胞受容体を認識しないことを証明している。Leu 11 陽性細胞は抗 CD3 抗体にほとんど反応せず、抗 CD3 誘導性細胞傷害能と NK、LAK 活性とは前駆細胞が異なると考えられる。Lanier ら⁴¹⁾も cell type の点から明確に NK 細胞と non-MHC-restricted CTL を区別し、この T 細胞は Leu 19⁺、CD 3⁺ 細胞であろうと報告している。最近、Phillips ら¹⁷⁾は抗 CD3 誘導性細胞傷害能は低比重、Leu 7⁺、Leu 11⁻ 細胞が担当細胞であろうと報告している。Leu 7⁺、CD 3⁺ 細胞は形態学的大顆粒リンパ球 (large granular lymphocyte, LGL) であることが知られている²⁵⁾。臍帯血では LGL あるいは Leu 11 陽性細胞は充分みられるが Leu 7 陽性細胞はほとんど存在せず⁴²⁾、そのために抗 CD3 誘導性細胞傷害能が誘導されない可能性がある。そこで、年齢別に Leu 7 陽性細胞の陽性率と抗 CD3 誘導性細胞傷害能について比較した結果、Leu 7 陽性細胞のほとんど認められない 1 歳までは傷害活性はほとんどなく、年齢毎に Leu 7 陽性率が高くなるほど傷害活性も増加していた。このことにより、Leu 7 陽性細胞が抗 CD3 誘導性細胞傷

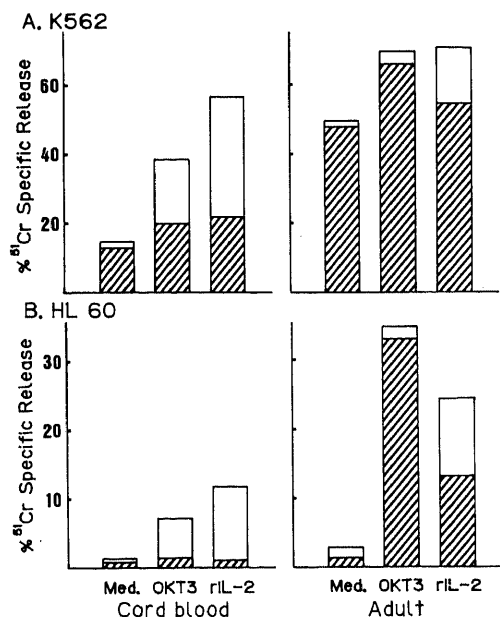


Fig. 5. Effects of anti-IL-2 antibody (L61) on anti-CD3-induced cytotoxicity in PBL from cord blood and adult.

PBL (2×10^6 /ml) with (shaded column) or without (open column) L61 antibody ($2.5 \mu\text{g/ml}$) were incubated for 24 hr with medium alone, OKT3 (50 ng/ml), or rIL-2 (150 u/ml), and were evaluated for anti-CD3-induced cytotoxicity against K562 (A) and HL60 (B). The effector to target cell ratio was 20:1. This figure shows the typical result of one of three experiments.

害能に強くかかわっている可能性が示唆され、そのため Leu 7 陽性細胞の少ない臍帯血では活性が誘導されにくいと推論されるが、抗 CD 3 誘導性細胞傷害能と Leu 7 陽性細胞の関係については今後の検討に残される点が多い。

結 論

臍帯血リンパ球を用いて、各種細胞傷害活性を検出し、以下の結果を得た。

1. NK 活性は臍帯血では成人の約半分の活性をも

ち、rIL-2 により成人と同レベルの増強がみられた。

2. LAK 活性は臍帯血では成人の 2/3 程度の誘導がみられ、これは rIFN- γ を同時に添加してもほとんど増強されなかった。

3. 抗 CD 3 誘導性細胞傷害能は成人では強い誘導がみられるが、臍帯血ではほとんど認められなかった。

4. 臍帯血及び 1 歳までの乳児末梢血では Leu 7 陽性細胞はほとんどなく、抗 CD 3 誘導性細胞傷害能も極めて微弱であったが、加齢に伴い Leu 7 陽性細胞が増加し、傷害活性の増加が認められた。抗 CD 3 誘導性

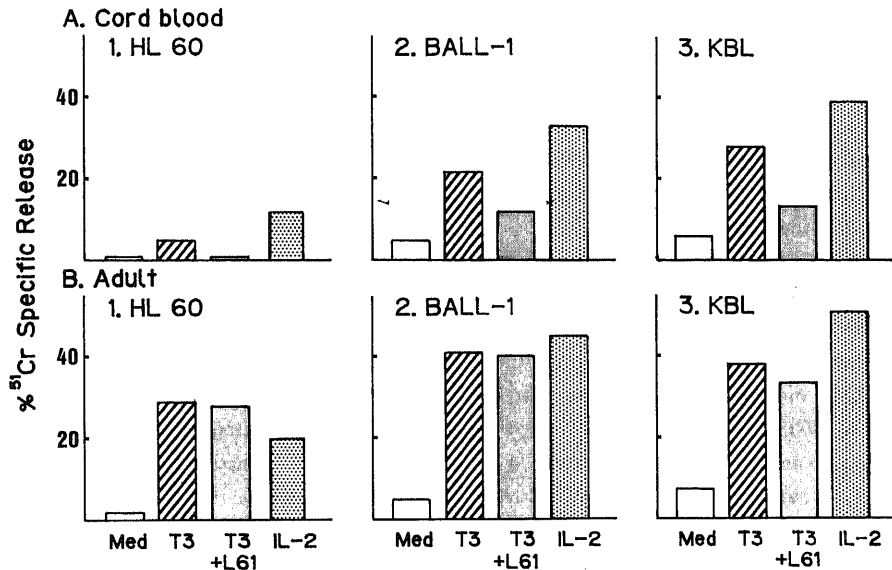


Fig. 6. Anti-CD 3-induced cytotoxicity against various target cells in PBL from cord blood (A) and adult (B).

PBL (2×10^6 /ml) were incubated for 24 hr with medium alone, OKT3 (50 ng/ml), OKT3 + L 61 antibody (2.5 μ g/ml), or rIL-2 (150 u/ml). 51 Cr-labeled target cells (1, HL60; 2, BALL-1; 3, KBL) were added to cultures at E: T ratio of 20:1. Cells were incubated for 4 hr and cytotoxicity was determined. This figure shows the typical result of one of three experiments.

Table 3. Lymphocyte subset and anti-CD3-induced cytotoxicity

PBL	subset (%)	% Cytotoxicity*				
		Leu 7	Leu 11	Medium	OKT3	rIL-2
Cord blood (N=9)	**	1.5 \pm 0.9	12.9 \pm 6.2	1.2 \pm 1.2	2.9 \pm 2.0	8.6 \pm 6.6
2-6 Months (N=6)	***	1.7 \pm 2.2	10.5 \pm 2.2	2.1 \pm 0.7	2.5 \pm 1.3	7.6 \pm 6.0
1-4 Years (N=5)		3.5 \pm 4.5	11.7 \pm 5.9	2.0 \pm 1.7	4.8 \pm 4.1	9.4 \pm 7.7
5-8 Years (N=6)		13.2 \pm 9.0	13.1 \pm 6.3	1.8 \pm 1.0	8.4 \pm 3.8	11.2 \pm 7.3
9-13 Years (N=4)		15.3 \pm 7.3	17.9 \pm 2.0	2.2 \pm 1.8	27.5 \pm 6.4	23.9 \pm 16.2
Adult (N=15)		19.6 \pm 6.6	17.1 \pm 3.8	2.8 \pm 3.3	38.4 \pm 16.8	22.4 \pm 8.8

*: PBL (2×10^6 /ml) were incubated with medium alone, OKT3 (50 ng/ml), and rIL-2 (150 u/ml) for 24 hr, and were evaluated for cytotoxicity against HL60. The effector to target cell ratio was 20:1.

** : number of samples.

*** : mean \pm SD.

細胞傷害能の誘導は Leu 7 陽性細胞の存在が関係深いと考えられるが、その詳細については今後の検討が必要である。

謝 辞

稿を終るに臨み、研究の御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部小児科谷口昂教授に深甚なる感謝の意を表します。また、直接御指導頂きました宮脇利男先生、関秀俊先生はじめ、終始研究に御協力頂きました小児科免疫グループ諸兄、並びに教室員の皆様に感謝致します。最後に、快く臍帯血を御提供下さいました金沢聖霊病院産科、大下陸郎先生に深謝致します。

文 献

- 1) Kiessling, R., Klein, E. & Wigzell, H.: "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.*, **5**, 112-117 (1975).
- 2) Ueno, Y., Miyawaki, T., Seki, H., Matsuda, A., Taga, K., Sato, H. & Taniguchi, N.: Differential effects of recombinant human interferon- γ and interleukin 2 on natural killer cell activity of peripheral blood in early human development. *J. Immunol.*, **135**, 180-184 (1985).
- 3) Seki, H., Ueno, Y., Taga, K., Matsuda, A., Miyawaki, T. & Taniguchi, N.: Mode of in vitro augmentation of natural killer cell activity by recombinant human interleukin 2: a comparative study of Leu-11⁺ and Leu-11⁻ cell populations in cord blood and adult peripheral blood. *J. Immunol.*, **135**, 2351-2356 (1985).
- 4) Uksila, J., Lassila, O., Hirvonen, T. & Toivanen, P.: Development of natural killer cell function in the human fetus. *J. Immunol.*, **130**, 153-156 (1983).
- 5) Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z. & Rosenberg, S. A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **155**, 1823-1841 (1982).
- 6) Grimm, E. A., Ramsey, K. M., Mazumder, A., Wilson, D. J., Djeu, J. Y. & Rosenberg, S. A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. II. Precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory cytotoxic thymus-derived lymphocytes, and natural killer cells. *J. Exp. Med.*, **157**, 884-897 (1983).
- 7) Grimm, E. A., Robb, R. J., Roth, J. A., Neckers, L. M., Lachman, L. B., Wilson, D. J. & Rosenberg, S. A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. *J. Exp. Med.*, **158**, 1356-1361 (1983).
- 8) Itoh, K., Tilden, A. B., Kumagai, K., & Balch, C. M.: Leu-11⁺ lymphocytes with natural killer (NK) activity are precursors of recombinant interleukin 2 (rIL 2)-induced activated killer (AK) cells. *J. Immunol.*, **134**, 802-807 (1985).
- 9) Itoh, K., Shiiba, K., Shimizu, Y., Suzuki, R. & Kumagai, K.: Generation of activated killer (AK) cells by recombinant interleukin 2 (rIL 2) in collaboration with interferon- γ (IFN- γ). *J. Immunol.*, **134**, 3124-3129 (1985).
- 10) Seeley, J. K. & Golub, S. H.: Studies on cytotoxicity generated in human mixed lymphocyte cultures. I. Time course and target spectrum of several distinct concomitant cytotoxic activities. *J. Immunol.*, **120**, 1415-1422 (1978).
- 11) Tomonari, K.: Cytotoxic T cells generated in the autologous mixed lymphocyte reaction. I. Primary autologous mixed lymphocyte reaction. *J. Immunol.*, **124**, 1111-1121 (1980).
- 12) Chang, T. W., Kung, P. C., Gingras, S. P. & Goldstein, G.: Dose OKT3 monoclonal antibody react with an antigen-recognition structure on human T cells? *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 1805-1808 (1981).
- 13) Suthanthiran, M., Williams, P. S., Solomon, S. D., Rubin, A. L. & Stenzel, K. H.: Induction of cytolytic activity by anti-T3 monoclonal antibody. Activation of alloimmune memory cells and natural killer cells from normal and immunodeficient individuals. *J. Clin. Invest.*, **74**, 2263-2271 (1984).
- 14) Leeuwenberg, J. F. M., Spits, H., Tax, W. J. M. & Capel, P. J. A.: Induction of nonspecific cytotoxicity by monoclonal anti-T3 antibodies. *J. Immunol.*, **134**, 3770-3775 (1985).
- 15) Spits, H., Yssel, H., Leeuwenberg, J. & Vries, J. E. D.: Antigen-specific cytotoxic T cell and antigen-specific proliferating T cell clones can be induced to cytolytic activity by monoclonal

- antibodies against T3. *Eur. J. Immunol.*, **15**, 88-91 (1985).
- 16) **Mentzer, S. J., Barbosa, J. A. & Burakoff, S. J.**: T3 monoclonal antibody activation of non-specific cytotoxicity: A mechanism of CTL inhibition. *J. Immunol.*, **135**, 34-38 (1985).
- 17) **Phillips, J. H. & Lanier, L. L.**: Lectin-dependent and anti-CD 3 induced cytotoxicity are preferentially mediated by peripheral blood cytotoxic T lymphocytes expressing Leu-7 antigen. *J. Immunol.*, **136**, 1579-1585 (1986).
- 18) **Wauwe, J. P. V., Mey, J. R. D. & Goossens, J. G.**: OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J. Immunol.*, **124**, 2708-2713 (1980).
- 19) **Reinherz, E. L., Hussey, R. E. & Schlossman, S. F.**: A monoclonal antibody blocking human T cell function. *Eur. J. Immunol.*, **10**, 758-762 (1980).
- 20) **Platsoucas, C. D. & Good, R. A.**: Inhibition of specific cell-mediated cytotoxicity by monoclonal antibodies to human T cell antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 4500-4504 (1981).
- 21) **Landegren, U., Ramstedt, U., Axberg, I., Ullberg, M., Jondal, M. & Wigzell, H.**: Selective inhibition of human T cell cytotoxicity at levels of target recognition or initiation of lysis by monoclonal OKT3 and Leu-2a antibodies. *J. Exp. Med.*, **155**, 1579-1584 (1982).
- 22) **Tsoukas, C. D., Valentine, M., Lotz, M., Vaughan, J. H. & Carson, D. A.**: The role of T3 molecular complex in antigen recognition and subsequent activation events. *Immunol. Today*, **5**, 311-313 (1984).
- 23) **Simonsen, M.**: May T3 protect us all. *Immunol. Today*, **5**, 314-315 (1984).
- 24) **Olding, L. B. & Oldstone, M. B. A.**: Lymphocytes from human newborns abrogate mitosis of their mother's lymphocytes. *Nature*, **249**, 161-162 (1974).
- 25) **Abo, T., Miller, C. A. & Balch, C. M.**: Characterization of human granular lymphocyte subpopulations expressing HNK-1 (Leu-7) and Leu-11 antigens in the blood and lymphoid tissues from fetuses, neonates and adults. *Eur. J. Immunol.*, **14**, 616-623 (1984).
- 26) **West, W. H., Cannon, G. B., Kay, H. D., Bonnard, G. D. & Herberman, R. B.**: Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: characterization of effector cells. *J. Immunol.*, **118**, 355-361 (1977).
- 27) **Miyawaki, T., Yachie, A., Ohzeki, S., Nagaoki, T. & Taniguchi, N.**: Cyclosporin A dose not prevent expression of Tac antigen, a probable TCGF receptor molecule, on mitogen-stimulated T cells. *J. Immunol.*, **130**, 2737-2742 (1983).
- 28) **Gillis, S., Ferm, M. M., Ou, W. & Smith, K. A.**: T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.*, **120**, 2027-2032 (1978).
- 29) **Miyawaki, T., Seki, H., Taga, K., 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).
- 30) **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**, 2015-2018 (1981).
- 31) **Seki, H., Taga, K., Matsuda, A., Uwadana, N., 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).
- 32) **Wakasugi, N. & Virelizier, J. L.**: Defective IFN- γ production in the human neonate. I. Dysregulation rather than intrinsic abnormality. *J. Immunol.*, **134**, 167-171 (1985).
- 33) **Meuer, S. C., Hussey, R. E., Cantrell, A. D., Hodgdon, J. C., Schlossman, S. F., Smith, K. A. & Reinherz, E. L.**: Triggering of the T3-Ti antigen-receptor complex results in clonal T-cell proliferation through an interleukin 2-dependent autocrine pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 1509-1513 (1984).
- 34) **Wussow, P., Platsoucas, C. D., Wiranowska-Stewart, M. & Stewart II, W. E.**: Human γ interferon production by leukocytes induced with monoclonal antibodies recognizing T cells. *J. Immunol.*, **127**, 1197-1200 (1981).

- 35) Chang, T. W., Testa, D., Kung, P. C., Perry, L., Dreskin, H. J. & Goldstein G.: Cellular origin and interactions involved in γ -interferon production induced by OKT3 monoclonal antibody. *J. Immunol.*, **128**, 585-589 (1982).
- 36) Green, W. R., Ballas, Z. K. and Henney, C. S.: Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. XI. The role of lectin in lectin-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.*, **121**, 1566-1572 (1978).
- 37) Lanier, L. L., Benike, C. J., Phillips, J. H. & Engleman, E. G.: Recombinant interleukin 2 enhanced natural killer cell-mediated cytotoxicity in human lymphocytes subpopulations expressing the Leu 7 and Leu 11 antigens. *J. Immunol.*, **134**, 794-801 (1985).
- 38) Lanier, L. L., Cwirla, S., Federspiel, N. & Phillips, J. H.: Human natural killer cells isolated from peripheral blood do not rearrange T cell antigen receptor β chain genes. *J. Exp. Med.*, **163**, 209-214 (1986).
- 39) Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R. & Phillips, J. H.: The relationship of CD 16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cell and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.*, **136**, 4480-4484 (1986).
- 40) Reynolds, C. W., Young, H., Yamada, S. & Ortaldo, J.: T cell receptor gene rearrangement and mRNA expression in human and rat LGL. *Red. Proc.*, **45**, 1137 (1986).
- 41) Lanier, L. L., Phillips, J. H., Hackett, J., Tutt, M. & Kumar, V.: Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J. Immunol.*, **137**, 2735-2739 (1986).
- 42) Abo, T., Cooper, M. D. & Balch, C. M.: Postnatal expansion of the natural killer and killer cell population in humans identified by the monoclonal HNK-1 antibody. *J. Exp. Med.*, **155**, 321-326 (1982).

The Cell Mediated Cytotoxicity of Peripheral Lymphocytes in Human Newborn
Akira Matsuda, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **96**, 269—278 (1987)

Key words: natural killer, lymphokine-activated killer, nonspecific cytotoxicity, anti-CD3-induced cytotoxicity, Leu-7⁺ cells

Abstract

This study was attempted to investigate the cell-mediated cytotoxicity, especially anti-CD3-induced cytotoxicity, of peripheral lymphocytes in the human neonate. Natural killer (NK) cell activity of human cord blood lymphocytes (CBL) against K562 target cells was observed to be low, compared with adult controls. Recombinant interleukin 2 (rIL2) could potentiate NK cell activity in CBL approximately to the adult levels, whereas lymphokine-activated killer cell activity induced by IL2 in CBL against NK resistant HL 60 cells was low and could not be augmented by the addition of gamma interferon. Anti-CD3 antibody can induce non-specific cytotoxicity in adult lymphocytes. However, anti-CD3-induced cytotoxicity in CBL against HL60 cells was extremely decreased. In contrast, anti-CD3 antibody augmented NK cell activity in CBL against K562 target cells. These effects were diminished by anti-IL2 monoclonal antibody, indicating that the effect of anti-CD3 antibody on NK boosting might be dependent on IL2 production. The proportion of CD16(Leu-11)⁺ NK cells in CBL was equal to the those of adult lymphocytes, whereas NK cells expressing Leu-7 antigens were negligible in CBL and lymphocytes of infants less than one year old. The percentage of Leu-7⁺ NK cells in the peripheral blood increase with age. Anti-CD3-induced cytotoxicity also gradually increased with child growth. These results indicated that a subset of CD3⁺, Leu-7⁺ lymphocytes may contribute to the anti-CD3-induced non-specific cytotoxicity.