

Regulatory Mechanisms of Interferon- γ Production in Human Neonate

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/2297/7853

ヒト新生児期のインターフェロン- γ 産生調節機構

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

多 賀 千 之

(昭和61年1月31日受付)

臍帯血リンパ球を用い、新生児期におけるインターフェロン- γ (interferon- γ , IFN- γ) の調節機構の特異性について検討した。臍帯血リンパ球の phytohemagglutinin (PHA) および recombinant interleukin-2 (rIL-2) 刺激による IFN- γ 産生は極めて低いが、OK-432 刺激および 1500 rad 放射線照射後の PHA 刺激により成人対照に匹敵する IFN- γ が産生された。また、抗ヒト IFN- γ モノクローナル抗体を用いた alkaline phosphatase monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP) 法により細胞質内 IFN- γ の存在が認められた。PHA 刺激後、12 時間以内に放射線照射した臍帯血リンパ球では IFN- γ 産生の著しい増強が認められたが、18 時間以降の照射では IFN- γ 産生の増強効果は認められなかった。即ち、本来新生児期の IFN- γ 産生能はすでに成熟段階に達しているが、この時期の PHA 誘導性 IFN- γ 産生能の低下は早期に活性化される放射線感受性の IFN- γ 産生抑制細胞が存在するためと考えられた。臍帯血リンパ球よりセルソーターで分画した OKT4 細胞・OKT8 細胞を放射線照射後培養すると、OKT4⁺ および OKT8⁻ 細胞分画に IFN- γ 産生の増強がみられたが、OKT8⁺ 細胞分画にはそのような増強効果は認められなかった。また、あらかじめ 24 時間 PHA 刺激前培養した臍帯血 OKT4⁺ 細胞は成人リンパ球および自己の放射線照射臍帯血リンパ球の IFN- γ 産生を添加細胞数に依存して抑制した。さらに、臍帯血リンパ球の 24 時間 PHA 刺激培養上清を成人リンパ球の PHA 刺激培養系へ添加すると IFN- γ 産生が抑制され、この培養上清の IFN- γ 産生抑制活性はセルロース膜による透析で消失した。以上の結果より、新生児期ではすでに IFN- γ 産生能は成熟に近いが、PHA 刺激により放射線感受性の OKT4⁺ 形質をもつ抑制細胞が活性化され IFN- γ 産生を調節し、その抑制作用の少なくとも一部は透析性の液性因子が関与していると考えられる。

Key words cord blood lymphocytes, interferon- γ production, OK432, OKT4 lymphocytes, suppressor cells

新生児、とくに未熟児が種々の感染症に罹患し易く、また重症化することの多いことはよく知られており、その原因は新生児の免疫機構の未熟性に求められてきた。即ち、新生児期の遅延型過敏反応の低下、ある種の抗原に対する反応性の低下、リンホトキシン産生の低下、リンパ球の各種細胞障害作用の低下、免疫グロブリン産生の低下、などが報告されている¹⁾²⁾。

一方、リンホカイン産生能ではリンホトキシンや migration inhibition factor の産生は低下しているが³⁾⁴⁾、T 細胞の増殖分化に重要な役割を演じているイ

ンターロイキン-2(interleukin-2, IL-2) の産生は成人と同等である⁵⁾。また、ウイルスにより誘導されるインターフェロン- α (interferon- α , IFN- α) の産生能は成人に匹敵するが⁶⁾、phytohemagglutinin (PHA) 刺激により誘導されるインターフェロン- γ (interferon- γ , IFN- γ) の産生は極めて低く、年齢と共に増強し 1~3 歳で成人レベルに達する⁶⁾。Wakasugi ら⁷⁾は臍帯血リンパ球を放射線照射することによりその PHA 誘導性 IFN- γ 産生が増強されることや、Staphylococcal enterotoxin A (SEA) 単独刺激によっても

Abbreviations: APAAP, alkaline phosphatase monoclonal anti-alkaline phosphatase; IFN- γ , interferon- γ ; PHA, phytohemagglutinin; rIL-2, recombinant interleukin-2; SEA, Staphylococcal enterotoxin A; ³H-TdR, ³H-thymidine.

IFN- γ が産生されることを報告している。このことは新生児期の IFN- γ 産生能はすでに成熟段階に達しているが、この時期の PHA 刺激時の IFN- γ 産生には特異な調節機構の存在することを暗示する。

IFN- γ 産生細胞に関する研究は多く、ヘルパー T 細胞や natural killer 細胞による IFN- γ 産生が知られているが^{9,10}、その調節機構に関する研究は少ない。マウスでは IFN- γ 産生がヘルパー細胞およびサブレッサー細胞により調節されているとの報告がみられるが^{10,11}、ヒトでは Papermaster ら¹²が成人 Leu-2⁺ リンパ球による IFN- γ 産生の抑制を報告しているだけであり、新生児の PHA 誘導性 IFN- γ 産生の抑制機構を研究することは IFN- γ 産生の調節機構を知る上で重要と考えられる。本研究では臍帯血リンパ球を使用し、この時期における IFN- γ 産生の調節機構の特異性について検討した。

材料および方法

I. リンパ球の分離

健康成人末梢血は 26~36 歳男子より、臍帯血は満期正常分娩児の臍帯より分娩直後に、ヘパリン加採血した。Ficoll-Hypaque Lymphoprep (Nyegaard & Co., Oslo, Norway) を用いた比重遠心法により単核細胞を採取し¹³、L-グルタミン (0.3 mg/ml)、ペニシリン (200 U/ml)、ゲンタマイシン (10 μ g/ml)、Hepes 緩衝液 (0.02 M, GIBCO, Grand Island, N. Y.), 5% 非動物ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地 (GIBCO) にて、 5×10^6 /ml に調節した。プラスチック皿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検索に使用した。

II. T 細胞サブセットの分離

臍帯血リンパ球を fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識モノクローナル抗体 OKT4 および OKT8 (Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, N. J.) にて標識し、Epics-C (Coulter Electronics, Hialeah, F. L.) セルソーターを用いて OKT4⁺・OKT8⁺ 陽性および陰性細胞を分離した¹⁴。

III. 培養条件

リンパ球は前述の RPMI 1640 培地にて 1×10^6 /ml に調節し、 13×100 mm のプラスチック培養試験管 (No.2027, Falcon Plastics, Oxnard, C. A.) を用い炭酸ガス培養恒温器 (37°C, 5% CO₂) 内で培養した。3 日間培養後、培養上清を採取し、IFN 活性測定まで -20°C に保存した。IFN インデューサーとして、0.1% PHA (DIFCO, Detroit, M. I.), 25 U/ml リコンビナント・インターロイキン-2 (recombinant IL-2, rIL-2, 塩野義製薬より供与)¹⁴、および、溶連菌製剤の 10 μ g/ml

OK432 (中外製薬より供与)¹⁵を使用した。

IV. 放射線照射

臍帯血リンパ球を培養前、あるいは、PHA 刺激培養各時間後に、東芝 KXC-18-2 型レントゲン照射装置を使用し 1500 rad 照射した。

V. 細胞質内 IFN- γ の染色

cytocentrifuge した培養細胞をアセトン固定し、抗ヒト IFN- γ モノクローナル抗体 (ニューヨーク大学、Le 博士より供与)¹⁶を用いた alkaline phosphatase monoclonal anti-alkaline phosphatase (APPAP, DAKO Co., Copenhagen, Denmark) 法により、細胞質内 IFN- γ を染色した¹⁷。後染色には Carrazi ヘマトキシリン核染色液を使用した。

VI. 混合培養

あらかじめ PHA 刺激にて 24 時間前培養した臍帯血リンパ球 ($1.25 \sim 10.0 \times 10^6$ 個) を、成人リンパ球あるいは 1500 rad 照射した臍帯血自己リンパ球 (5×10^6 個) に添加した。全量を 1 ml に調節した後、PHA 刺激にてさらに 3 日間培養し、PHA 活性化臍帯血リンパ球の IFN 産生抑制効果を検討した。

IFN 産生の抑制率は次の式で算定した。

$$\text{抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{PHA 活性化臍帯血リンパ球添加時の PHA 誘導性 IFN 活性}}{\text{PHA 誘導性 IFN 活性}} \right) \times 100$$

VII. 液性因子の検討

臍帯血リンパ球を PHA 刺激にて 24 時間培養し、その上清を採取した。成人リンパ球の培養系へ種々の濃度添加し、PHA 刺激で 3 日間培養して IFN 産生に及ぼす抑制効果を検討した。

同時に培養上清をセルロース透析膜 (三光純薬) を使用して RPMI 1640 培地で 4°C, 24 時間透析し、同様に IFN 産生に対する抑制効果を検討した。IFN 産生抑制率は前述と同様の式で求めた。

また、成人リンパ球の幼若化反応に対する臍帯血リンパ球培養上清の影響を検討した。即ち、96 穴平底マイクロプレート (No.3072, Falcon Plastics) を使用し、臍帯血リンパ球上清を成人リンパ球 1×10^6 個に種々の濃度添加、PHA 刺激 2 日後 ³H-サイミジン (³H-Thymidine, ³H-TdR) を各穴に 0.2 μ Ci ずつ添加し、1 日後 ³H-TdR の取り込みを測定した。

VIII. IFN 活性の測定

IFN 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⁹。即ち、96 穴平底マイクロプレートに培養上清の 2 倍希釈系列を作成し、FL 細胞を各穴に分注した。24 時間培養した後、至適濃度に希釈した Sindbis virus を各穴に分注した。さらに 24 時間培養後、1%クリスタルバ

イオレット液(第一試薬)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活性とした。

また、PHAおよびOK432刺激培養上清について、pH2処理(pH2グリシン塩酸緩衝液にて24時間透析)、熱処理(56°C, 1時間)、抗ヒトIFN- α ウサギ血清(Interferon Science Inc., New Brunswick, N. J.)および抗ヒトIFN- γ モノクローナル抗体(塩野義製薬より供与)による中和試験(37°C, 2時間)を行ない、IFNの性状を検討した。

成 績

I. IFN産生能

成人リンパ球はPHA, rIL-2, OK432刺激により高単位のIFN産生が認められた(図1)。一方、臍帯血リンパ球ではPHAやrIL-2刺激によるIFN産生は極めて低いが、OK432刺激では成人対照と同程度のIFN産生が認められた。また、あらかじめ1500rad照射した臍帯血リンパ球のPHA誘導性IFN産生は成人リンパ球に近い値を示した。

II. IFNの性状

成人リンパ球および1500rad照射臍帯血リンパ球のPHA刺激培養上清中に存在するIFN活性はいず

れも、pH2処理・熱処理により失活した。さらに、抗ヒトIFN- α ウサギ血清では中和されなかったが、抗ヒトIFN- γ モノクローナル抗体により完全に中和された(表1)。以上より、いずれのPHA刺激培養上清中のIFNも“ γ ”型(immune型)であることが確認された。また、成人リンパ球および臍帯血リンパ球のOK432誘導性IFNについても同様の結果が得られた。

III. 細胞質内IFN- γ の染色

PHA刺激および1500rad照射後PHA刺激した成人リンパ球では共に、一部芽球化したリンパ球が存在し、リンパ球の細胞質内にfast blue BB salt(SIGMA)によって顆粒状に染まるIFN- γ が認められた(図2)。一方、PHA刺激臍帯血リンパ球では芽球化したリンパ球は成人対照と同程度認められたが、細胞質内にfast blue BB saltの顆粒はほとんど認められなかった。1500rad照射後PHA刺激した臍帯血リンパ球では細胞質内にfast blue BB saltによって顆粒状に染まるIFN- γ が認められた。

IV. 放射線照射リンパ球によるIFN- γ 産生の経時的変化

成人リンパ球では未照射リンパ球・放射線照射リンパ球共にPHA刺激12時間後より有意なIFN- γ 産生

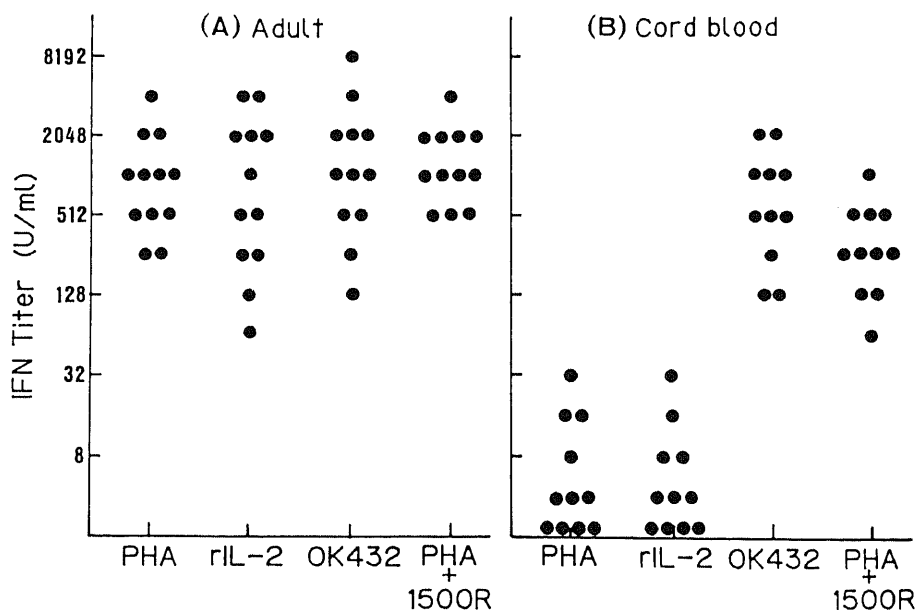


Fig. 1 (A,B). Induction of IFN production by adult and cord blood lymphocytes. Adult (A) or cord (B) blood lymphocytes (1×10^6 cells/ml) were stimulated with PHA (0.1%), rIL-2 (25 u/ml) or OK-432 (10 μ g/ml) for 3 days. In some experiments, lymphocytes were irradiated with 1,500 rad before PHA-stimulation. After culture, the culture supernatants were assayed for IFN activity.

がみられた。未照射リンパ球に比べ照射リンパ球の方がわずかながら高い IFN- γ 産生が認められた(図3)。一方、臍帯血リンパ球では前述の如く未照射リンパ球の IFN- γ 産生はほとんど認められなかったが、照射リンパ球では成人リンパ球の培養とは少々遅れ、刺激 24 時間後より IFN- γ 産生が認められた。

V. 放射線照射による IFN- γ 産生増強効果の kinetics

PHA 刺激培養後、各時間に臍帯血リンパ球を放射線照射した(図4)。放射線照射による IFN- γ 産生増強効果は PHA 刺激後 12 時間以内の照射では著明にみられたが、18 時間後の照射では減少し、24 時間後の照

Table 1. Characterization of IFN produced by PHA- or OK-432-stimulated lymphocytes

Source of IFN	IFN titer after treatment (U/ml) ^a				
	None	Anti-IFN- α	Anti-IFN- γ	pH 2	56°C
Recombinant IFN- α	1,024 ^c	4	1,024	512	512
Recombinant IFN- γ	512	512	4	16	< 4
Adult; PHA-induced	512	512	4	8	< 4
OK-432-induced	512	512	4	4	< 4
Cord; PHA-induced (with 1,500 R) ^b	256	256	4	4	< 4
OK-432-induced	1,024	1,024	4	4	< 4

^aExperimental details are given in the text

^bCord MNC were irradiated with 1,500 rad and stimulated with PHA

^cThe values represent one of four representative experiments with similar results

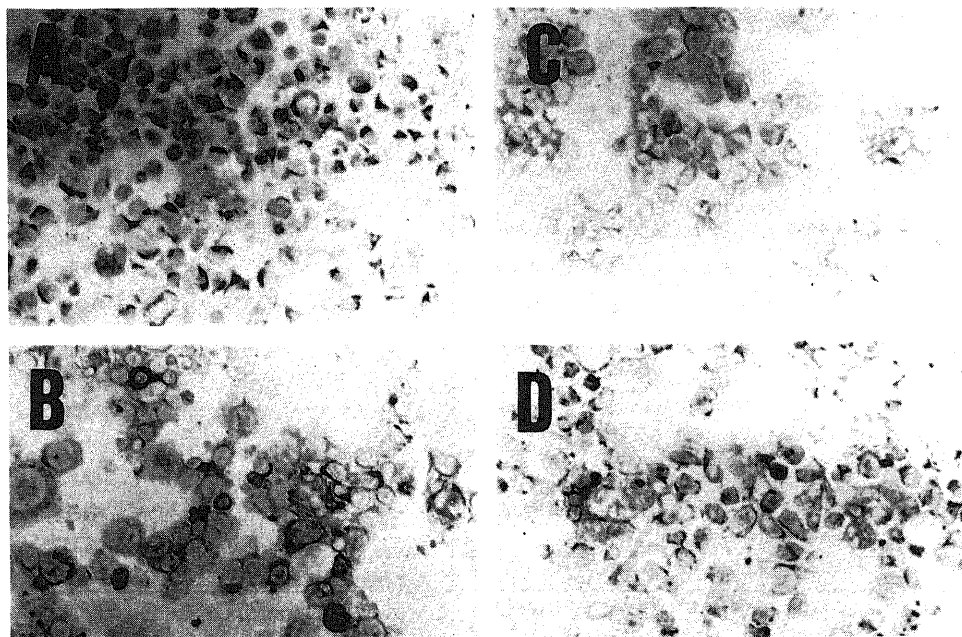


Fig. 2 (A-D). Alkaline phosphatase immunostaining of cultured lymphocytes PHA-stimulated lymphocytes were cytocentrifuged onto glass slide, stained with the anti-IFN- γ monoclonal antibody by APAAP technique. (A) Adult blood lymphocytes. (B) Irradiated adult blood lymphocytes. Both staining revealed many IFN- γ containing lymphocytes. (C) Cord blood lymphocytes. IFN- γ containing lymphocytes were few. (D) Irradiated cord blood lymphocytes. Many lymphocytes contained IFN- γ clearly.

射では完全に消失した。以上より、臍帯血リンパ球には PHA により約 18 時間以内に活性化される放射線感受性 IFN- γ 産生抑制リンパ球が存在することが示唆された。

VI. 臍帯血リンパ球サブセットによる IFN- γ 産生

臍帯血リンパ球の IFN- γ 産生抑制細胞のサブセットを検討するために、セルソーターにより OKT4 細胞および OKT8 細胞を分離し、1500 rad 照射して PHA 誘導性 IFN- γ 産生を測定した。OKT4⁺ 細胞および OKT8⁻ 細胞では未分画リンパ球と同様照射後 PHA 誘導性 IFN- γ 産生の著明な増強が認められた(図 5)。一方、OKT4⁻ 細胞は放射線未照射状態でも PHA 刺激により高単位の IFN- γ 産生が認められたが、放射線照射による IFN- γ 産生の増強は軽度であった。OKT8⁺ 細胞は PHA 誘導性 IFN- γ 産生は低く、放射線照射による IFN- γ 産生の増強もほとんど認められなかった。以上より、放射線感受性の IFN- γ 産生抑制細胞は主に臍帯血 OKT4⁺/OKT8⁻ 細胞に含まれることが示唆された。

VII. 成人リンパ球 IFN- γ 産生に対する臍帯血リンパ球の抑制活性

臍帯血リンパ球と成人リンパ球を同時混合培養し、

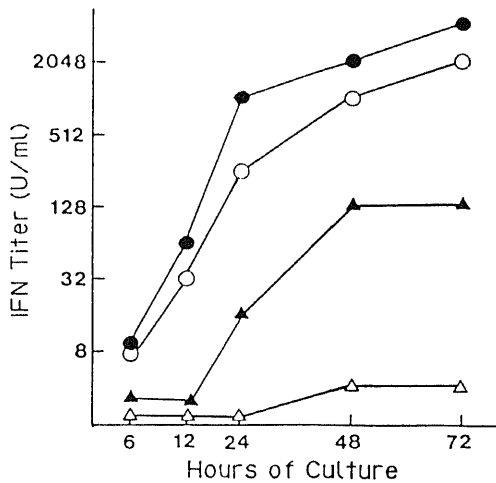


Fig. 3. Kinetics of PHA-induced IFN- γ production by irradiated or non-irradiated lymphocytes. Irradiated (1,500 rad) (●—●) or non-irradiated (○—○) lymphocytes (1×10^6 cells/ml) from adult, and irradiated (▲—▲) or non-irradiated (△—△) lymphocytes from cord blood were cultured with PHA for various time periods. After culture, the culture supernatants were assayed for IFN- γ activity.

臍帯血リンパ球による PHA 誘導性 IFN- γ 産生抑制能を検討したが、一定した IFN- γ 産生の抑制は観察されなかった。そこで、臍帯血の未分画リンパ球、分離した OKT4⁺ 細胞、OKT4⁻ 細胞を PHA 刺激にてあらかじめ 24 時間前培養した後、成人リンパ球に添加してさらに PHA 刺激で 3 日間培養した。臍帯血未分画リンパ球および OKT4⁺ 細胞はその添加細胞数に依存して成人リンパ球の IFN- γ 産生を抑制した(図 6)。一方、臍帯血 OKT4⁻ 細胞はこのような抑制活性が認められなかった。

また、PHA 前培養臍帯血未分画リンパ球は自己の放射線照射リンパ球の IFN- γ 産生も同様に抑制した(表 2)。

VIII. 液性因子の検討

臍帯血リンパ球の IFN- γ 産生抑制作用における液性因子の関与を検討するために、臍帯血リンパ球を PHA にて 24 時間刺激し、その培養上清を成人リンパ球の培養系に各種濃度添加した。臍帯血リンパ球培養上清の添加量に依存して成人リンパ球の PHA 誘導性 IFN- γ 産生が抑制された(図 7)。

また、セルロース膜による 24 時間透析により、臍帯血リンパ球培養上清の抑制活性はほとんど消失した(表 3)。

なお、培養上清を各種濃度添加して成人リンパ球の PHA 刺激による幼若化反応を検討したが、IFN- γ 産生を抑制する濃度においても抑制効果は認められなかった(表 4)。

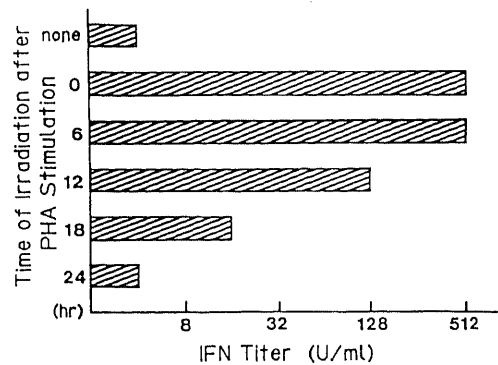


Fig. 4. Kinetics of augmentation of PHA-induced IFN- γ production by irradiation. Cord blood lymphocytes (1×10^6 cells/ml) were cultured in the presence of PHA and irradiated with 1,500 rad at various time interval of the initiation of culture. After 3 days of culture, the culture supernatants were assayed for IFN- γ activity.

考 察

IFN は白血球由来の α 型, 線維芽細胞由来の β 型, リンパ球由来の γ 型の 3 種類に分かれ, その生物学的特性もそれぞれ違っている¹⁸⁾. IFN- γ は免疫調節機構において, 抗体産生の調節¹⁹⁾, マクロファージの Ia 様抗原出現の増強²⁰⁾, IL-2 産生の調節²¹⁾, IL-2 レセプター発現の調節²²⁾, natural killer 活性の増強²³⁾などと多面的な役割を演じており, IFN- γ 産生の調節機構を解明することは重要である. 新生児ではリンパ球の PHA 誘導性 IFN- γ 産生は極めて低下していることはよく知られているが¹⁶⁾, その原因に関して不明な点が多く残されている.

臍帯血リンパ球の PHA や rIL-2 刺激による IFN 産生能は従来の報告通り極めて低下していたが, 溶連菌製剤である OK432 刺激では成人リンパ球に匹敵する IFN を産生し, また, あらかじめ 1500 rad の放射線照射により PHA 誘導性 IFN も著明に増強した. この産生された IFN はいずれも pH 2 処理および熱処理で失活し, 抗ヒト IFN- γ モノクローナル抗体によって中和されたことより, “ γ ” 型 (immune 型) であることが確認された. また, cytocentrifuge した培養細胞を抗ヒト IFN- γ モノクローナル抗体を用いて

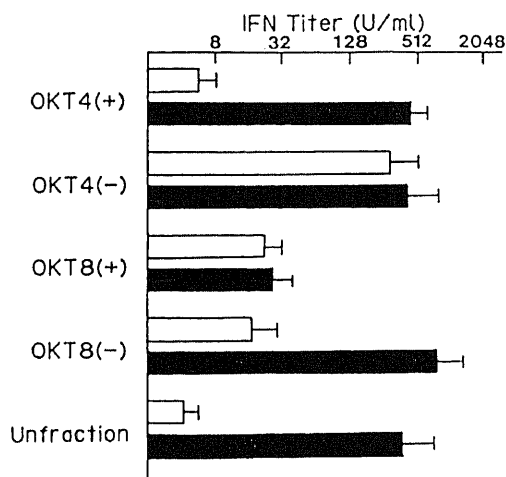


Fig. 5. Effect of irradiation on IFN- γ production by cord T cell subsets. Irradiated with 1,500 rad (■) or non-irradiated (□) cord T cell subsets (1×10^6 cells/ml) were cultured in the presence of PHA. After 3 days, cultures were harvested and assayed for IFN- γ activity. Results are expressed as the mean \pm SD of four separated experiments.

APAAP 法により染色し, 放射線照射後 PHA 培養した臍帯血リンパ球の細胞質内には IFN- γ が増量することが証明された. 最近, Wakasugi ら²⁴⁾も臍帯血リンパ球が SEA 刺激により成人リンパ球と同程度に IFN- γ を産生したと報告しており, 本来の IFN- γ 産生能は出生時よりすでに成人に近いものと考えられる.

臍帯血リンパ球の PHA 誘導性 IFN- γ 産生の低下の原因に関して, Taylor ら²⁴⁾は T 細胞およびマクロファージの未熟性によると報告し, また, Wakasugi ら²⁵⁾は IFN- γ 産生細胞のプロスタグランジン E に対する感受性の亢進によると報告している. しかし, 放射線照射により IFN- γ 産生が著しく増強することから, O'Malley ら⁸⁾, Vilček ら⁹⁾も推論しているような放射線感受性の IFN- γ 産生抑制細胞が臍帯血リンパ球の IFN- γ 産生系にも存在すると考えられる. OK432 刺激による臍帯血リンパ球の IFN- γ 産生は旺盛にみられたことから, OK432 刺激ではこのような抑制細胞は活性化され難いものと考えられる. また, 結果は示していないが, 臍帯血リンパ球の rIL-2 誘導性 IFN- γ 産生は放射線照射後も増強されず, その低下の原因は不明である.

さらに, 臍帯血リンパ球の放射線照射による IFN- γ

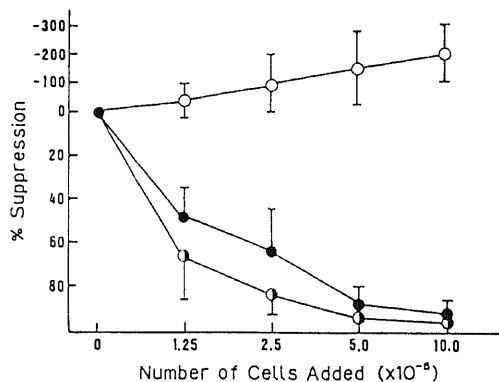


Fig. 6. Effect of PHA-activated cord blood lymphocytes on IFN- γ production. Graded numbers of unfractionated (○—○), OKT4⁺ (●—●) or OKT4⁻ cells (□—□) from cord blood, which were pre-stimulated with PHA for 24 hr, were added to fresh adult blood lymphocytes (5×10^5 cells) and cultured for further 3 days in the presence of PHA. After culture, the culture supernatants were assayed for IFN- γ activity. Results are expressed as a percent suppression compared with control cultures without adding cord blood lymphocytes. Each point represents the mean \pm SD of four separated experiments.

Table 2. Effect of PHA-activated cord MNC on IFN- γ production by irradiated autologous cells^a

No. of added cells ($\times 10^5$)	IFN titer (U/ml)		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
none	1,024	512	512
1.25	256	256	256
2.5	64	128	128
5.0	16	64	32
10.0	8	16	16

^aGraded numbers of PHA-activated cord MNC were added to irradiated (1,500 rad) autologous cells (5×10^5) which had been preserved at 4°C. After 3 days of culture with PHA, the culture supernatants were assayed for IFN- γ activity.

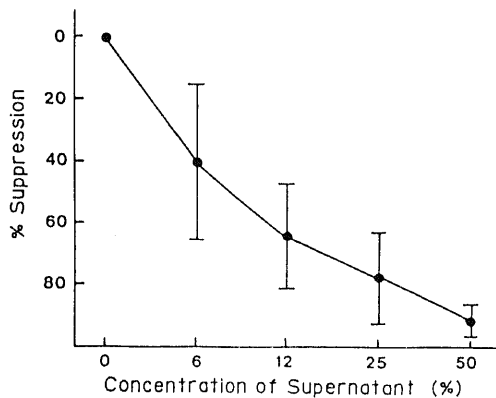


Fig. 7. Effect of PHA-activated supernatants from cord blood lymphocytes on IFN- γ production. PHA-activated supernatants were obtained from cord blood lymphocytes culture which were previously stimulated with PHA for 24 hr, and were added to adult blood lymphocytes (1×10^6 cells/ml) cultures at various concentrations in the presence of PHA for 3 days. After culture, the culture supernatants were assayed for IFN- γ activity. Results are expressed as a percent suppression compared with control cultures without adding the supernatants. Each point represents the mean \pm SD of five separated experiments.

産生の増強は、PHA 刺激 18 時間後の照射では低下し、PHA 刺激で誘導される抑制細胞はかなり早期に活性化されると考えられる。しかし、Wakasugi ら²¹⁾の報告と同様、臍帯血リンパ球と成人リンパ球の同時混合培養で IFN- γ 産生の抑制が一定しなかったのは、成人リンパ球の IFN- γ 産生開始が臍帯血リンパ球の抑

Table 3. Effect of dialysis of the supernatants on the suppressive activity for IFN- γ Production^a

Exp.	IFN titer (U/ml)		
	no added supernatant	50% supernatant	
		not treated	dialyzed
1	4,096	124	4,096
2	4,096	32	2,048
3	2,048	256	2,048
4	1,024	256	1,024
5	1,024	62	512

^aPHA-activated supernatants from cord MNC cultures were dialyzed against RPMI 1640 medium for 24 hr and added to adult MNC cultures at 50% concentration. After 3 days of culture with PHA, IFN- γ activity of culture supernatants were assayed.

制活性の出現より早いと認められる。

新生児期 T 細胞は成人 B 細胞の免疫グロブリン産生細胞への分化を抑制することが知られているため²⁾、IFN- γ 産生における抑制 T 細胞のサブセットを検討した。OKT4⁺あるいは OKT8⁻細胞において放射線照射後の PHA 誘導性 IFN- γ 産生が著しく増強されることより、PHA 刺激により活性化される抑制細胞は主に OKT4⁺/OKT8⁻細胞に存在すると考えられた。さらに、あらかじめ 24 時間 PHA 刺激した臍帯血未分画リンパ球や OKT4⁺細胞は添加細胞数に依存して成人の IFN- γ 産生を抑制した。一方、OKT4⁻細胞にはこのような抑制は認められなかった。また、PHA 刺激臍帯血リンパ球は自己の放射線照射リンパ球の IFN- γ 産生をも抑制した。OKT4⁺細胞がヘルパー/インデューサー T 細胞で、OKT8⁻細胞がサプレッサー/キラー T 細胞であるとされている²⁶⁾、最近、OKT4⁺細胞の機能的異質性が指摘されている^{27)~29)}。新生児において OKT4⁺細胞は pokeweed mitogen (PWM) 刺激培養系において T 細胞の免疫グロブリン産生細胞への分化を抑制することが報告されている²⁾。しかし、今回の研究では、この B 細胞分化抑制細胞と IFN- γ 産生抑制細胞の異同に関しては不明である。

臍帯血リンパ球を 24 時間 PHA 刺激した培養上清にも IFN- γ 産生抑制活性が認められ、IFN- γ 産生抑制機序の少なくとも一部は液性因子を介しており、この液性因子は透析性で比較的低分子物質の可能性が示唆された。臍帯血リンパ球の B 細胞分化抑制作用が PWM 刺激により臍帯血 T リンパ球より分泌される透析性の液性因子を介していることが報告されている

Table 4. Effect of PHA-activate supernatants on proliferation of adult lymphocytes^a

Supernatant (%)	Exp. 1		Exp. 2	
	IFN(U/ml)	³ H-TdR(cpm) ^b	IFN(U/ml)	³ H-TdR(cpm)
0	4,096	23,311	2,048	25,645
12	2,048	24,779	1,024	27,891
25	512	25,717	256	31,543
50	128	28,234	64	33,912

^aPHA-activated supernatants from cord blood were added to adult MNC cultures at various concentrations in the presence of PHA. After 3 days of culture, IFN- γ production and uptake of ³H-TdR were measured.

^b³H-TdR incorporation was determined in triplicate samples.

が³⁰⁾~³²⁾, この IFN- γ 産生抑制液性因子との異同は不明である。

以上の結果より、臍帯血リンパ球の PHA 誘導性 IFN- γ は、PHA 刺激により早期に活性化される放射線感受性の OKT4⁺ 形質をもつ抑制 T 細胞により調節を受け、この抑制機序の少なくとも一部は透析性の液性因子が関与しているものと推定される。新生児期の IFN- γ 産生における抑制 T 細胞の存在はこれまでに報告されておらず、このような新生児の IFN- γ 産生機構の特異性は免疫応答の理解をする上で重要と考えられる。

結 論

臍帯血リンパ球の各種刺激下での IFN- γ 産生能を検討し、新生児期における IFN- γ 産生の調節機構に関して以下の結果を得た。

1. 臍帯血リンパ球の PHA および rIL-2 刺激による IFN- γ 産生は極めて低いが、OK432 刺激および 1500 rad 放射線照射後の PHA 刺激により成人対照に匹敵する IFN- γ 産生が認められ、このような所見は免疫組織学的にも確められた。

2. PHA 刺激後、12 時間以内に放射線照射した臍帯血リンパ球では IFN- γ 産生の著しい増強が認められたが、18 時間以降の照射では IFN- γ 産生の増強効果は消失した。

3. 臍帯血リンパ球より分画した OKT4 細胞および OKT8 細胞を放射線照射後 PHA 刺激培養すると、OKT4⁺ 細胞および OKT8⁻ 細胞分画に IFN- γ 産生の増強が認められた。

4. あらかじめ 24 時間 PHA 刺激前培養した臍帯血 OKT4⁺ 細胞は成人リンパ球および自己の放射線照射臍帯血リンパ球の IFN- γ 産生を抑制した。

5. 臍帯血リンパ球の 24 時間 PHA 刺激培養上清を成人リンパ球の PHA 刺激培養系へ添加すると、

IFN- γ 産生が抑制された。この培養上清の IFN- γ 産生抑制活性はセルロース膜による透析で消失した。

6. 以上の結果より、新生児期ではすでに IFN- γ 産生能は成熟に近いが、PHA 刺激により早期に放射線感受性の OKT4⁺ 形質をもつ抑制細胞が活性化され IFN- γ 産生を調節し、その抑制作用の少なくとも一部は透析性の液性因子が関与していると考えられる。

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の諸兄、並びに教室員の皆様に深謝致します。

なお、本論文の要旨は、第 15 回日本免疫学会総会(1985)において発表した。

文 献

- 1) Stiehm, E. R., Winter, H. S. & Bryson, Y. J.: Cellular (T cell) immunity in the human newborn. *Pediatrics* **64**(Suppl), 814-821 (1979).
- 2) Miyawaki, T., Moriya, N., Nagaoki, T. & Taniguchi, N.: Maturation of B-cell differentiation ability and T-cell regulatory function in infancy and childhood. *Immunol. Rev.*, **57**, 61-87 (1981).
- 3) Eife, R. F., Eife, G., August, C. S., Kuhre, W. L. & Staehr-Johansen, K.: Lymphotoxin production and blast cell transformation by newborn lymphocytes; Dissociated lymphocyte function in newborn infants. *Cell. Immunol.*, **14**, 435-442 (1974).
- 4) Winster, H. S., Bryson, Y. J., Gard, S. E., Fisher, T. J. & Stiehm, E. R.: Deficiency of monocyte migration inhibition factor and immune interferon production in lymphocytes of normal

newborns. *Pediatr. Res.*, **12**, 488 (1978).

5) **Bryson, Y. N., Winter, H. S., Gard, S. E., Fischer, T. J. & Stiehm, E. R.**: Deficiency of immune interferon production by leukocytes of normal newborns. *Cell. Immunol.*, **55**, 191-200 (1980).

6) **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).

7) **Wakasugi, N. & Virelizier, J.**: Defective IFN- γ production in the human neonate. I. Dysregulation rather than intrinsic abnormality. *J. Immunol.*, **134**, 167-171 (1985).

8) **O'Mally, J. A., Nussbaum-Blumenson, A., Sheedy, D., Grossmayer, B. J. & Ozer, H.**: Identification of the T cell subset that produces human γ interferon. *J. Immunol.*, **128**, 2522-2526 (1982).

9) **Vicek, J., Henriksen-DeStefano, D. S., Siegel, A. K., Klion, Robb, R. J. & Le, J.**: Regulation of IFN- γ induction in human peripheral blood cells by exogenous and endogenously produced interleukine 2. *J. Immunol.*, **135**, 1851-1856 (1985).

10) **Torres, B. A., Farrar, W. L. and Johnson, H. M.**: Interleukine 2 regulates immune interferon (IFN- γ) production by normal and suppressor cell cultures. *J. Immunol.*, **128**, 2217-2219 (1982).

11) **Torres, B. A., Yamamoto, J. K. & Johnson, H. M.**: Cellular regulation of gamma interferon production; Lyt phenotype of the suppressor cells. *Infect. Immun.*, **35**, 770-776 (1982).

12) **Papermaster, V., Torres, B. A. & Johnson, H. M.**: Evidence for suppressor T-cell regulation of human gamma interferon production. *Cell. Immunol.*, **79**, 279-287 (1983).

13) **Olding, L. B. & Oldstone, M. B. A.**: Lymphocytes from human newborns abrogate mitosis of their mothers' lymphocytes. *Nature*, **249**, 161-162 (1974).

14) **Seki, H., Ueno, Y., Taga, K., Matsuda, A., Miyawaki, T. & Taniguchi, N.**: Mode of *in vivo* augmentation of natural killer cell activity by recombinant human interleukin-2: a comparative study of Leu-11⁺ and Leu-11 cell population in cord blood and adult peripheral blood. *J. Immunol.*, **135**, 2351-2356 (1985).

15) **Chirigos, M. A., Saito, T. & Talmadge, J. E.**: The immunomodulatory activity of picibanil (OK432), p20-31. *In* T. Hoshino & A. Uchida (ed.), *Clinical and experimental studies in immunotherapy*, Excerpta Medica, Tokyo, 1983.

16) **Chang, T. W., McKinney, S., Liu, V., Kung, P. C., Vilcek, J. & Le, J.**: Use of monoclonal antibodies as sensitive and specific probes for biologically active human γ -interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5219-5222 (1984).

17) **Cordell, J. L., Falini, B., Erber, W. N., Ghosh, A. K., Abdulaziz, Z., Macdonald, S., Pulford, K. A. F., Stein, H. & Mason, D. Y.**: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J. Histochem. Cytochem.*, **32**, 219-229 (1984).

18) **Trinchieri, G. & Perussia, B.**: Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol Today*, **6**, 131-136 (1985).

19) **Leibson, H. J., Gefter, M., Zlotnik, A., Marrack, P. & Kapples, J. W.**: Role of γ -interferon in antibody-producing responses. *Nature*, **309**, 799-801 (1984).

20) **Le, J., Prenskey, W., Yip, Y. K., Chang, Z., Hoffman, T., Stevenson, H. G., Balazs, I., Sadlik, J. R. and Vilcek, J.**: Activation of human monocyte cytotoxicity by natural and recombinant immune interferon. *J. Immunol.*, **131**, 2821-2826 (1983).

21) **Farrar, W. L., Johnson, H. M. & Farrar, J. J.**: Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2. *J. Immunol.*, **126**, 1120-1125 (1981).

22) **Johnson, H. M. & Farrar, W. L.**: The role of a gamma interferon-like lymphokine in the activation of T cells for expression of interleukin 2 receptors. *Cell. Immunol.*, **75**, 154-159 (1983).

23) **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).

24) **Taylor, S. & Bryson, Y. J.**: Impaired production of γ -interferon by newborn cells *in vitro* is due to a functionally immature macrophage. *J.*

Immunol., 134, 1493-1497 (1985).

25) Wakasugi, N., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Rothhut, B., Huerta, J. M. M., Russo-Marie, F. & Fiers, W.: Defective IFN- γ production in human neonate. II. Role of increased sensitivity to the suppressive effects of prostaglandin E. J. Immunol., 134, 172-176 (1985).

26) Reinherz, E. I., Kung, P. C., Goldstein, G. & Schlossman, S. F.: Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4061-4065 (1979).

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

28) Thomas, Y., Rogozinski, L., Irigoyen, O. H., Shen, H. H., Talle, M. A., Goldstein, G. & Chess, L.: Functional analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies. J. Immunol., 128, 1386-1390 (1982).

29) Morimoto, G., 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).

30) Nagaoki, T., Moriya, N., Miyawaki, T., Seki, H., Kubo, M., Yokoi, T., Okuda, N. & Taniguchi, N.: Suppression of B-cell differentiation by dialyzable humoral factors derived from pokeweed mitogen-stimulated cord T cells. J. Immunol., 125, 1563-1568 (1980).

31) Miyawaki, T., Moriya, N., Nagaoki, T., Kubo, M., Yokoi, & Taniguchi, N.: Mode of action of humoral suppressor factor derived from pokeweed mitogen-stimulated cord T cells on adult B cell differentiation. J. Immunol., 126, 282-285 (1981).

32) Olding, L. B., Murgita, R. A. & Wigzell, H.: Mitogen-stimulated lymphoid cells from human newborns suppress the proliferation of maternal lymphocytes across a cell-impermeable membrane. J. Immunol., 119, 1109-1114 (1977).

Regulatory Mechanisms of Interferon- γ Production in Human Neonate Kazuyuki Taga, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. J. J. Med. Soc., 95, 113-123 (1986)

Key words: cord blood lymphocytes, interferon- γ production, OK432, OKT4 lymphocytes, suppressor cells

Abstract

Cord blood lymphocytes (CBL) were deficient in their ability of interferon- γ (IFN- γ) production on stimulation with phytohemagglutinin (PHA) or recombinant interleukin 2, whereas OK-432, a streptococcal preparation, could induce a large amount of IFN- γ from cord MNC comparable to adult blood lymphocytes (ABL). It is of interest that irradiation of 1,500 rad before PHA-stimulation could restore the deficient ability of IFN- γ production by CBL. By means of the alkaline phosphatase monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP) technique, cytoplasmic IFN- γ was clearly demonstrated in PHA-stimulated CBL after irradiation. Kinetic studies indicated that such augmentation of IFN- γ production by irradiation was evident when CBL were irradiated prior to or by 12 hr of PHA-stimulated culture. But, irradiation after 18 hr of PHA-stimulation or later did not exert any augmenting effect on IFN- γ production by CBL. It seemed most likely that the genuine ability of IFN- γ production was mature already at birth, but that radiosensitive suppressor effectors for IFN- γ production might be activated within CBL at

an early stage of PHA-stimulation, resulting in poor IFN- γ production by CBL.

PHA-induced IFN- γ production by OKT4⁺ or OKT8⁻ cells from CBL, but not OKT8⁺, was markedly enhanced by irradiation of 1,500 rad before the culture. Co-culture experiments disclosed that OKT4⁺, but not OKT4⁻, cells from CBL, when pre-stimulated with PHA for 24 hr, exerted active suppression on PHA-induced IFN- γ production by ABL in a dose-dependent manner. Additionally, the culture supernatants obtained from prestimulated CBL with PHA also profoundly suppressed IFN- γ production by ABL, but their suppressive activity disappeared after the dialysis of the supernatants. These results suggested that, on PHA-stimulation, radiosensitive suppressor effectors on IFN- γ production were induced within OKT4⁺ subset of CBL, and that their suppressor activity might be, at least in part, mediated via dialyzable humoral factor(s).