

活性化リンパ球の造血幹細胞に及ぼす影響：Concanavalin A 誘導 suppressor T cell による顆粒球-マクロファージ前駆細胞の抑制

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/2297/9091

活性化リンパ球の造血幹細胞に及ぼす影響

—Concanavalin A 誘導 suppressor T cell による
顆粒球-マクロファージ前駆細胞の抑制—

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 服部絢一教授)

尾 高 和 亮

(昭和58年10月12日受付)

近年造血幹細胞の分化増殖は免疫学的機序ことにリンパ球によっても調節されることが明らかにされてきた。このようなリンパ球の造血機構へ関与するメカニズムを明らかにするため、*in vitro* 免疫グロブリン産生やリンパ球混合培養などの免疫反応に抑制的に作用することで知られている Concanavalin A (Con A) 誘導 suppressor cell の造血幹細胞に及ぼす影響を検討した。

Con A 刺激細胞と骨髓単核細胞を coculture し、軟寒天法にて colony forming unit in culture (CFU-c) assay を行い以下の結論を得た。Con A 誘導 suppressor cell は CFU-c を dose dependent に抑制し、その抑制活性は $10 \mu\text{g/ml}$ の Con A で 48 時間培養した際に最も強い抑制が認められた。この抑制細胞は X-ray (2000 rad) 感受性の T 細胞であり、抑制活性発現のためには human leukocyte antigen (HLA) の一致を必要としない。

さらに抑制活性は液性因子を介したものであり、cell-to-cell の接触を必要とせず、マクロファージは関与していない。またエステラーゼ 2 重染色した結果からは、顆粒球コロニー、マクロファージコロニーを同程度に抑制した。

この抑制活性は OKT3, OKT8 と補体処理により解除される一方、OKT4, OKIa1 では解除されず、免疫反応と同様に OKT3, OKT8 陽性細胞が造血幹細胞に対しても suppressor cell として働いていることが確かめられた。しかしながら、両者が全く同一のサブセットに属するかどうかは不明であり、今後検討すべき問題である。

Key words Concanavalin A induced suppressor cells, CFU-c, Monoclonal antibody.

造血幹細胞に関する研究は *in vitro* コロニー法による定量的測定法の確立により、近年著しい進歩をとげ、単能性幹細胞^{1)~4)}だけでなく、人の多能性幹細胞と考えられる mixed colony forming unit (CFU-mix)⁵⁾⁶⁾ の測定も可能になっている。すでに、再生不良性貧血 (以下再不貧と略す) などの種々の造血異常を示す疾患では、それぞれの病態が造血幹細胞レベルで把握できるようになってきている。さらに、造血幹細胞の分化増殖における調節機構も詳細に調べられており、最近ではその調節機構に免疫学的機序も関与しうること

が明らかにされつつあり、造血調節機構における、regulatory cell としてのリンパ球の役割が注目されている。たとえば、一部の再不貧患者において、造血幹細胞を抑制するリンパ球の存在することが明らかにされてきた。Kagan ら⁷⁾によれば、再不貧患者骨髓の顆粒球-マクロファージ系幹細胞である colony forming unit in culture (以下 CFU-c と略す) が抗リンパ球血清で処理すると対照に比較してコロニー形成が上昇すること、患者骨髓からリンパ球を除去するとコロニー形成が上昇すること、および患者骨髓細胞と正常人骨

Effects of Activated Lymphocytes on Hematopoietic Stem Cells. —Suppression of Granulocyte-Macrophage Progenitor Cells by Concanavalin A Induced Suppressor T Cells.
Kazuaki Odaka Department of Internal Medicine (III), (Director: Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University.

髄細胞を混合培養すると正常人骨髓の CFU-c が減少することを報告した。Hoffman ら⁹⁾も再不貧患者末梢血リンパ球が正常人骨髓の赤芽球系幹細胞である erythroid colony forming unit (以下 CFU-E と略す) の形成を抑制することを報告している。さらに、Amare ら⁹⁾は再不貧 6 例中 1 例において患者骨髓中に自己および正常人骨髓 CFU-c を抑制する T リンパ球を見出している。以上の報告の他にも、再不貧患者末梢血リンパ球が造血幹細胞を抑制するという成績が相次いで報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。また再不貧に対して骨髓移植を行ったが、前処置としての免疫抑制剤や抗リンパ球血清使用後、移植骨髓でなく自己骨髓の回復がみられた報告が数多くなされた¹²⁾¹³⁾。これらの報告例において、その回復機序は免疫抑制による造血抑制性リンパ球の除去が考えられ、移植骨髓を使用しない免疫抑制剤の単独療法が再不貧の一治療法として確立されつつある¹⁴⁾¹⁵⁾。Bacigalupo ら¹⁷⁾によれば、20 例の再不貧患者のうち 10 例に骨髓リンパ球が CFU-c を抑制することを認め、10 例全部が抗リンパ球グロブリン、anti-lymphocyte globulin (以下 ALG と略す)、methyl-prednisolone などの免疫抑制療法にて寛解したことを報告している。European group¹⁸⁾によれば、170 例の重症再不貧に対して免疫抑制療法が実施された結果、1 年生存率 62.7% という好成績が得られたという。

さらにモノクローナル抗体などの新しい免疫学的方法を導入することにより、造血幹細胞とリンパ球との相互の関連が解明されるようになってきた。Torok-Storb ら¹⁹⁾は、正常人末梢血単核球をモノクローナル抗体で処理後、赤芽球バースト形成細胞、erythroid burst forming unit (以下 BFU-E と略す) の測定を行い、処理後にコロニー形成能が上昇したり、減少したりすることを認め、末梢血リンパ球中に BFU-E に対して促進的、あるいは抑制的に働く 2 つのリンパ球サブセットが存在することを示唆する成績を報告している。

本研究では造血幹細胞に対して調節的作用を有するリンパ球の性質と、そのメカニズムを明らかにするため、suppressor T cell を誘導することで知られている concanavalin A (以下 Con A と略す)²⁰⁾によって活性化されたリンパ球の CFU-c におよぼす影響を検討し、興味ある成績を得たので報告する。

材料および方法

I. 末梢血単核球, peripheral blood mononuclear cell (以下 PBMNC と略す) と T 細胞の分離
健康成人から得たヘパリン加静脈血を Ficoll-

Hypaque 比重遠心法によって分離し、ペニシリン G 100 U/ml, ストレプトマイシン 100 μ g/ml を含む RPMI-1640 培養液 (GIBCO) で 3 回洗浄して、PBMNC を得た。

T 細胞の分離はノイラミダーゼ (Behring, Lot No. 253007B) 処理羊赤血球 (以下 SRBC と略す) と前述の方法で得られた PBMNC を非働化牛胎児血清, fetal calf serum (以下 FCS と略す) (Flow laboratory, Lot No. 70330) を含む RPMI-1640 培養液にそれぞれ 1×10^8 /ml と 5×10^6 /ml の濃度に調整し、それぞれ等量を混合し、200 g, 5 分間遠心後、4°C, 60 分以上静置した。その後 pellet を静かに再浮遊させ、Ficoll-Hypaque に静かに重層した。400 g, 30 分遠心後、境界にバンドを形成したロゼット非形成細胞を採取し、3 回洗浄してこれを non-T 細胞とした。一方採取したロゼット形成細胞を含む pellet は tris-NH₄Cl buffer で溶血させ、3 回洗浄してこれを T 細胞とした。このようにして得られた T 細胞には E ロゼット形成細胞が 90% 以上含まれており、ペルオキシダーゼ陽性細胞の混入率は 1% 以下であった。

II. Con A 刺激細胞及び培養上清の作製

PBMNC または T 細胞, non-T 細胞を 15% FCS 加 RPMI-1640 培養液に 1×10^6 /ml となるように調整し、これに 10 μ g/ml の至適濃度 (後述) の Con A (Sigma, Lot No. 71F-7190) を添加して、37°C, 5% CO₂ の条件で 48 時間培養した。培養後遠心により培養上清を採取し、-20°C にて凍結保存しておいた。Pellet は 3 回洗浄して、Con A 刺激細胞を得た。0.25% トリパンプルーを用いた色素排泄試験によって viable cell を算定した結果、この Con A 刺激細胞の viability は 95% 以上であった。

III. 骨髓単核細胞, bone marrow mononuclear cell (以下 BMMNC と略す) の分離

健康成人または鉄欠乏性貧血など正常な CFU-c 形成を示す患者から採取したヘパリン加骨髓穿刺液より BMMNC を Ficoll-Hypaque 比重遠心法によって分離し、ペニシリン G 100 U/ml, ストレプトマイシン 100 μ g/ml 加 McCoy 5A 培養液 (Flow) で 3 回洗浄して実験に用いた。

一部の試験では、dimethyl sulfoxide (DMSO) を用いて凍結保存しておいた BMMNC を使用した²¹⁾。

マクロファージ (M ϕ) を除いた非付着性骨髓単核細胞 (non adherent BMMNC) を使用する場合は、BMMNC を 10% FCS 加 McCoy 5A 培養液で 5×10^6 /ml の濃度に調整し、60 mm プラスティックシャーレ (Falcon # 3030) に入れ、37°C, 5% CO₂ で 30 分間静置し、付着細胞を除去した。

また BMMNC と SRBC を 40%FCS 加 McCoy 5A 培養液で、それぞれ $5 \times 10^6/\text{ml}$ と $1 \times 10^8/\text{ml}$ の濃度に調整し、I と同様の方法により、ロゼット非形成細胞を採取し、3 回洗浄して T 細胞除去骨髓単核細胞 (T cell-depleted BMMNC) を得た。こうして得られた T cell-depleted BMMNC 中の T 細胞混入率は 10% 以下であった。

IV. 骨髓細胞の軟寒天培養法

Pike & Robinson²²⁾ の 2 重寒天法に準じて CFU-c assay を行った。まず下層として、末梢白血球 1×10^6 個を寒天 0.5% 含む 15%FCS 加 McCoy 5A 培養液 1 ml に加えて、35 mm のプラスチックシャーレ (Falcon # 3010) に入れゲル化させる。上層として BMMNC の場合では 1×10^6 個、nonadherent, T cell-depleted BMMNC の場合 0.5×10^6 個に、Con A 刺激細胞、あるいは培養上清を適当な濃度に添加し、これに寒天を 0.3% 含む 15%FCS 加 McCoy 5A 培養液を加えて、総量 1 ml を下層の feeder layer に重層した。37°C, 5%CO₂ にて 10~12 日間培養後、倒立顕微鏡 (Olimpus, Model CK) にて 40 個以上の細胞からなるものをコロニーとして算定した。成績は、Con A 刺激細胞も培養上清も加えずに BMMNC 単独で培養したものを control として、%control で示した。なお、一部の実験では人胎盤培養上清, human placental condition medium (以下 HPCM と略す)²³⁾ を用いた単層法で CFU-c assay を行った。

V. 抗体処理

抗体処理には ALG (Anti-human lymphocyte globulin, Hoechst), 末梢血 T 細胞に対するモノクローナル抗体 T101 (UCLA Dr. Gale より供与)²⁴⁾, OKT3, OKT4, OKT8, OKIa1 (Ortho Diagnostic Systems)²⁵⁾ を使用した。ALG, T101 は 100 倍稀釈液 0.2 ml に、その他は原液 10 μl に $1 \times 10^7/\text{ml}$ 濃度の Con A 刺激細胞を 0.2 ml 加えて、0~4°C, 30 分間 incubate した。Incubation 終了後培養液で 1 回洗浄し、上清 0.5 ml を残して再浮遊させ、これに 3 倍稀釈のウサギ乾燥補体 (Behring, Lot No. 029959A) 0.5 ml を加えて、37°C, 30~45 分間 incubate した。1 回洗浄後細胞数を再調整せずに、処理前の細胞濃度として再浮遊させ coculture に使用した。抗体処理がうまく行われたかどうかを確認するために、処理細胞の一部を採取し 0.25% トリパンプルーを用いた色素排泄試験により viability を算定した。

VI. X線照射

Con A 刺激細胞を 10 ml の培養液にて再浮遊させ、X線照射装置 (東芝 KXC-18) を用いて 168.2 rad/分、12 分間、計 2000 rad 照射後、実験に使用した。

VII. エステラーゼ染色

染色は Konwalinka らの方法²⁶⁾²⁷⁾ によって行った。まず上層の軟寒天をスライドガラス上に取りだし、ろ紙をかぶせて、ドライヤーにて乾燥させた。緩衝ホルマリン-アセトン液にて固定後、水洗、乾燥させた。 α -naphthyl butyrate を用いた非特異的エステラーゼ染色の後、naphthol AS-D chloro-acetate を用いたクロロアセテートエステラーゼ染色を行った。水洗、乾燥後鏡検して、コロニーの分類を行った。

VIII. 統計学的検討

T 検定を用いて平均値の有意差検定を行い $p < 0.05$ の時を有意差ありと判定した

成 績

I. Con A 刺激細胞の至適培養条件

Con A 刺激細胞作製の際に添加する Con A の至適濃度を決定するため、10%FCS 加 RPMI-1640 培養液

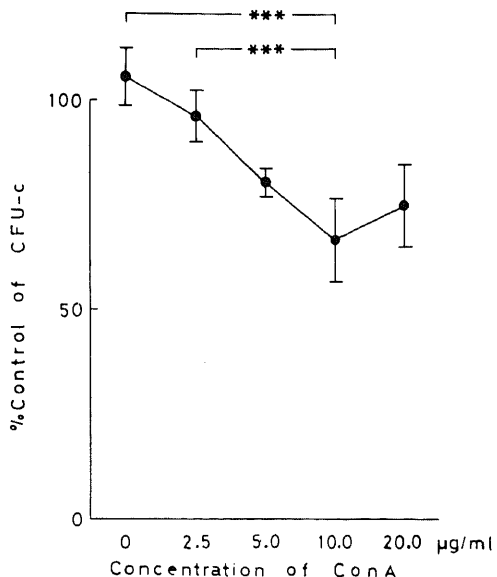


Fig. 1. An optimal concentration of Concanavalin A (ConA) for the induction of colony forming unit in culture (CFU-c)/suppressor cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) were incubated for 48hrs with various concentration of ConA. After incubation, ConA stimulated cells were normal bone marrow mononuclear cells (BMMNC) at a 1 : 1 ratio just prior to CFU-c assays. Each point represents the mean \pm standard deviation (SD) of %control CFU-c in 5 experiments. Control CFU-c were obtained when BMMNC were cultured without addition of ConA-stimulated PBMNC.

*** $p < 0.005$

中に PBMNC を 1×10^6 /ml に調整し、これに 0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Con A をそれぞれ加え、 37°C , 5% CO_2 の条件で 48 時間培養した。培養後得られた Con A 刺激細胞 1×10^5 個に BMMNC 1×10^5 個を加えて coculture した。図 1 に示すように Con A 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で $66.7 \pm 10.7\%$ と最もコロニー形成が少なく、0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Con A で刺激した場合に比べ、有意の差 ($p < 0.005$) が認められたが、他の濃度とは有意差は認められなかった。したがって 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が至適濃度と考えられたので、以下の実験には Con A 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で刺激して得られた PBMNC を使用した。

つぎに、Con A 刺激細胞作製のための至適培養時間を決定するために、以下の実験を行った。同一人より 96, 72, 48, 24 時間前に採血して得た PBMNC に 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Con A を加え、96, 72, 48, 24 時間培養した。培養後それぞれの Con A 刺激細胞を同時に採取し 1×10^5 個に、BMMNC を 1×10^5 個ずつ加えて coculture した。その結果は図 2 に示すように 48 時間培養で $54.6 \pm 15.8\%$ と最もコロニー形成が少なかった。しかし 24, 72 時間培養との間で抑制率に有意差はみられなかった。そこで有意差はなかったが、以下の実験では培養時間は 48 時間とした。

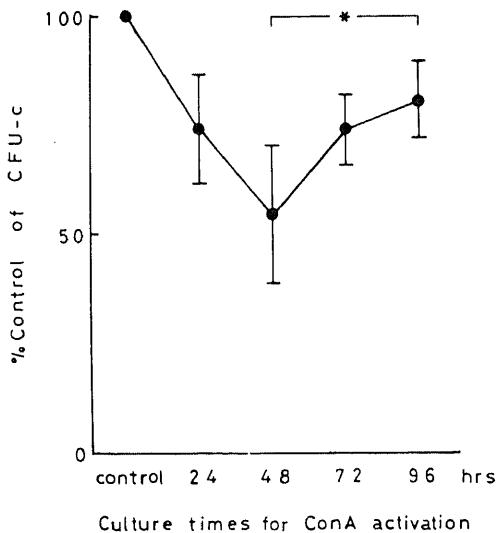


Fig. 2. An Optimal duration for ConA activation. After incubation of PBMNC with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ConA for various length of time. ConA-stimulated cells were added to normal BMMNC at a 1 : 1 ratio just prior to CFU-c assays. Each point represents the mean \pm SD of %control CFU-c in 4 experiments.

* $p < 0.05$

II. Preincubation の影響

Con A 刺激細胞と BMMNC をそれぞれ 2×10^5 /ml となるように 15% FCS 加 McCoy 5A 培養液で調整し、 37°C , 5% CO_2 の条件下で 2 時間の preincubation を行った後、Con A 刺激細胞と BMMNC がそれぞれに 1×10^5 個 (1 ml) となるように 0.3% 寒天、15% FCS を加えた McCoy 5A 培養液に浮遊させ、CFU-c assay を行った。Preincubation を行わずに CFU-c assay を行った場合に比べて preincubation が CFU-c 抑制率に影響を及ぼすかどうか検討したものが図 3 である。CFU-c 形成は preincubation を行った場合 $72.3 \pm 10.1\%$ 、行わなかった場合 $74.2 \pm 9.4\%$ となり両者に全く差を認めず、したがって preincubation は CFU-c 形成の抑制に影響しないことが明らかになったので、以下の実験では preincubation を行わずに coculture による検討を行った。

II. Con A 刺激細胞の影響

BMMNC 1×10^5 個に、Con A 刺激細胞と、非刺激細胞を、それぞれ 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0×10^5 個加えて coculture を行った。その結果は図 4 に示されるように、Con A 非刺激細胞を加えた場合の CFU-c 形成は control に比べ、有意差はないが増加する傾向がみ

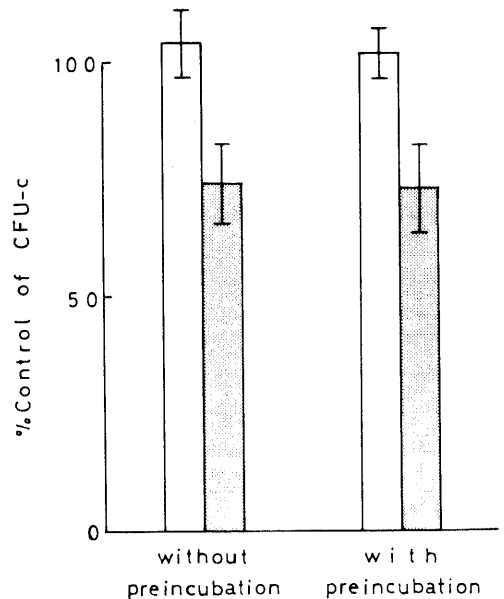


Fig. 3. Effects of 2 hrs-preincubation of BMMNC with ConA-activated PBMNC on CFU-c suppression. BMMNC were incubated with unstimulated (open columns) and ConA-activated (shaded columns) cells for 2 hrs before CFU-c assays. Each column represents the mean \pm SD of % control CFU-c in 4 experiments.

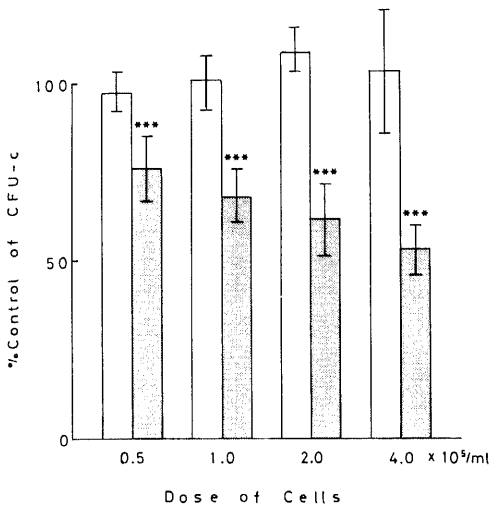


Fig. 4. Dose-dependent suppression of CFU-c by ConA-activated cells. BMMNC were cocultured with various number of unstimulated (open columns) and ConA-activated (shaded columns) cells. Each value represents the mean \pm SD of % control CFU-c in 7 experiments. *** $p < 0.005$

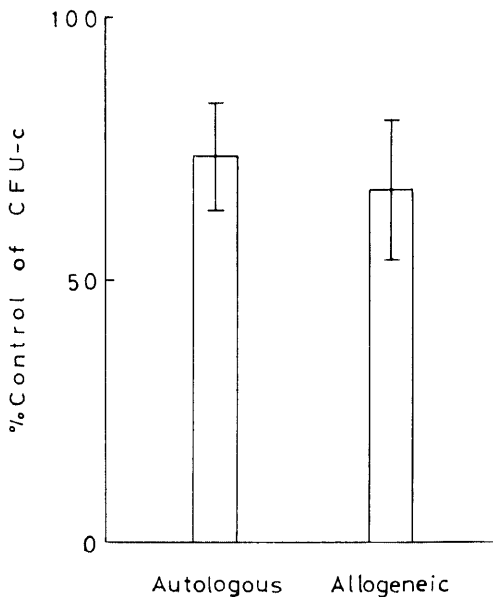


Fig. 5. Effects of autologous or allogeneic PBMC activated with ConA on CFU-c. Each value represents the mean \pm SD of % control CFU-c in 5 experiments.

られた。一方、Con A 刺激細胞添加では 0.5×10^5 個以上の添加で有意な抑制が認められ、それは dose-dependent であった。

さらに、添加する Con A 刺激細胞が骨髄提供者と autologous か、allogeneic かによって抑制率に差があるかどうかを検討した。その結果、図 5 に示されるように両者で抑制率に有意の差を認めなかった。

IV. 培養上清の影響

Con A 刺激細胞作製の際に得られた培養上清を 5, 10, 20% の各濃度添加して、CFU-c assay を行った。図 6 に示すように Con A 非刺激細胞の培養上清では control とほとんど差がなかった。Con A 刺激細胞の培養上清では dose-dependent な抑制を認め、20% 添加で CFU-c は $61.3 \pm 4.5\%$ に減少した。また図には示していないが、 $2 \mu g$ の Con A を直接 CFU-c assay に加えた場合は $94.8 \pm 8.2\%$ と control と差がなかった。

つぎに、培養上清中に含まれる Con A が BMMNC 中の T 細胞を活性化する可能性が考えられるので、BMMNC から T 細胞を除去した T cell-depleted

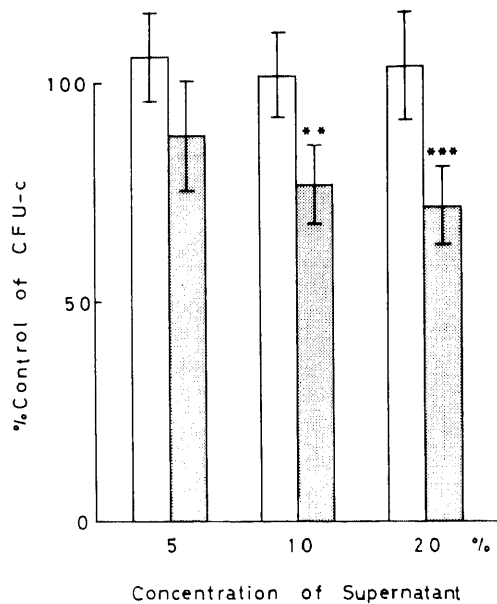


Fig. 6. Effects of supernatants from ConA-stimulated lymphocytes on CFU-c. After incubation of PBMNC without (open columns) or with (shaded columns) of ConA for 48 hrs cultured supernatants were saved and tested for their effects on CFU-c. Various concentrations of the supernatants were added to the assay systems for CFU-c. Each value represents the mean \pm SD of % control CFU-c in 5 experiments.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$

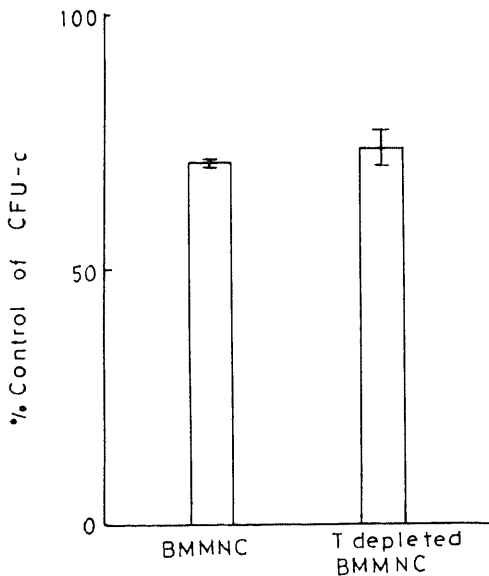


Fig. 7. Effects of T cells contaminated in BMMNC on CFU-c suppression. BMMNC or T cell depleted BMMNC were cocultured with supernatant from ConA activation. Each value represents the mean \pm SD of % control CFU-c in 4 experiments.

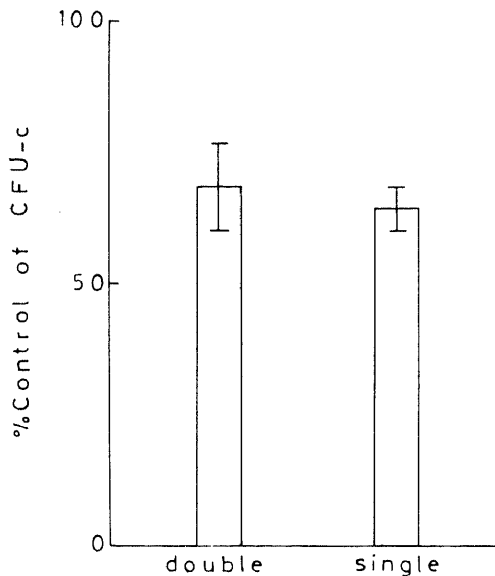


Fig. 8. Comparison of double and single layer method in the suppression of CFU-c by ConA-activated lymphocytes. CFU-c assays for coculture studies were separately done by double layer method of Pike & Robinson or single layer method of using as a colony stimulating factor (CSF) source of human placental conditioned medium (HPCM). Each value represents the mean \pm SD of % control CFU-c in 7 experiments.

BMMNCを用いて、培養上清の影響をみた。図7はその結果を示したものでT細胞を除去することによって抑制率に有意の差は認められなかった。

V. 単層法と2重寒天法による比較

Con A 刺激細胞と BMMNC をそれぞれ 1×10^6 個ずつ加えて、HPCM を用いた単層法にて CFU-c assay を行った。図8に2重寒天法によって行った結果との比較を示した。単層法では $64.4 \pm 4.2\%$ 、2重寒天法では $68.6 \pm 8.2\%$ で両者に有意差はみられなかった。

VI. 抗体処理とX線処理の影響

まず、Con A 刺激細胞を ALG, T101 monoclonal 抗体と補体による処理を行った後 BMMNC との coculture を行った。つぎに、Con A 刺激細胞の放射線感受性をみるために 2000 rad の X 線照射の影響を検討した。その結果は図9に示すように無処理の場合と補体のみで処理した場合は、CFU-c の形成はそれぞれ $71.9 \pm 11.1\%$ 、 $72.8 \pm 7.6\%$ とコロニー形成の抑制を認めたが、ALG または T101 と補体による抗体処理では $94.9 \pm 6.3\%$ 、 $97.1 \pm 11.6\%$ 、X線照射では $97.1 \pm 6.5\%$ といずれもコロニー形成はコントロール近くに回復し、抑制の解除が認められた。

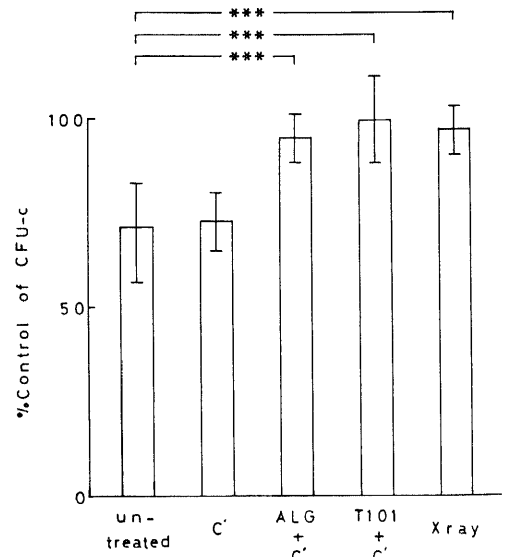


Fig. 9. Effects of pretreatments of ConA-activated cells with anti-lymphocyte globulin (ALG) or radiation on CFU-c suppression. ConA-activated cells were treated with ALG or T101 and rabbit complement, and 2000rad of X-ray radiation before the cocultures with BMMNC. Each value represents the mean \pm SD of % control CFU-c in 6 experiments.

*** $p < 0.005$

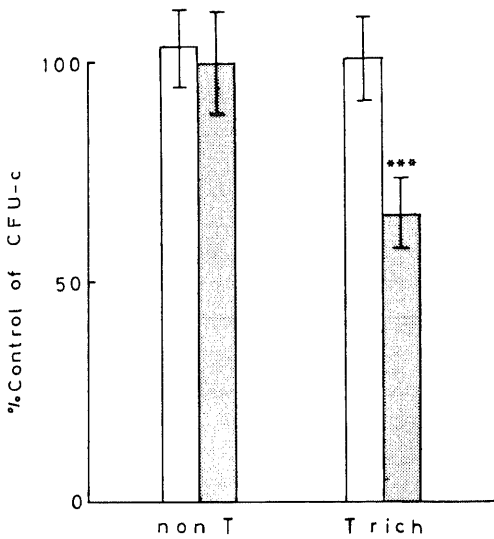


Fig. 10. Effects of ConA-activated T or non-T cells on CFU-c suppression. Open columns indicate unstimulated and shaded columns indicate ConA-activated cells. Each value represents the mean \pm SD of %control CFU-c in 7 experiments. *** $p < 0.005$

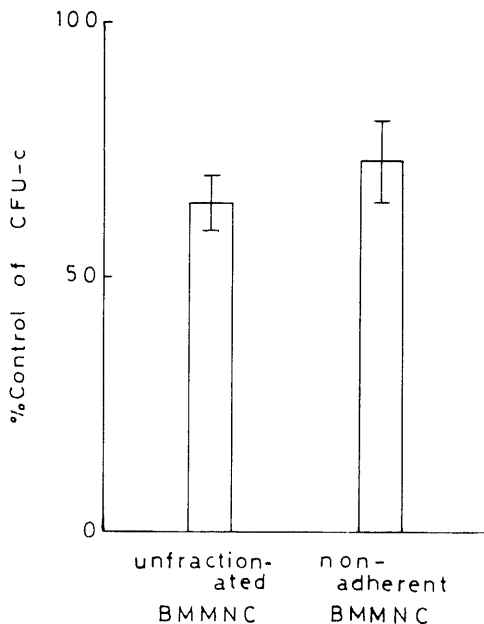


Fig. 11. Effects, of macrophage in BMMNC on CFU-c suppression. Adherent cell-depleted BMMNC were cocultured with ConA-activated T cells. Each value represents the mean \pm SD of % control in 7 experiments.

VII. Con A 刺激 T 細胞, non-T 細胞の影響

既に述べた方法で T 細胞, non-T 細胞に分離し, それぞれ Con A 刺激細胞を作製し, BMMNC との coculture を行った. 結果は図 10 に示されるように, 非刺激細胞では T 細胞, non-T 細胞とも control とほぼ同程度の CFU-c 形成がみられ, また Con A 刺激 non-T 細胞でも同様であった. 一方, Con A 刺激 T 細胞では $65.2 \pm 8.1\%$ とコロニー形成は有意の低下 ($p < 0.005$) を示した.

VIII. マクロファージ除去による影響

Con A 刺激 T 細胞を BMMNC (M ϕ を含む), または M ϕ を除去した nonadherent BMMNC と, それぞれ 1×10^6 個ずつ coculture した結果を図 11 に示した. BMMNC では $64.8 \pm 5.4\%$, nonadherent BMMNC では $73.0 \pm 8.1\%$ と, BMMNC のほうが少し強い抑制をうける傾向がみられたが, 両者で有意差はみられなかった.

IX. Con A 刺激 T 細胞のモノクローナル抗体処理による影響

Con A 刺激 T 細胞を OKT3, OKT4, OKT8, OKIa1 モノクローナル抗体並びに補体にて処理した後, BMMNC 1×10^6 個と処理済 Con A 刺激 T 細胞をそれぞれ 2×10^6 個ずつ加えて coculture した. 図 12 に

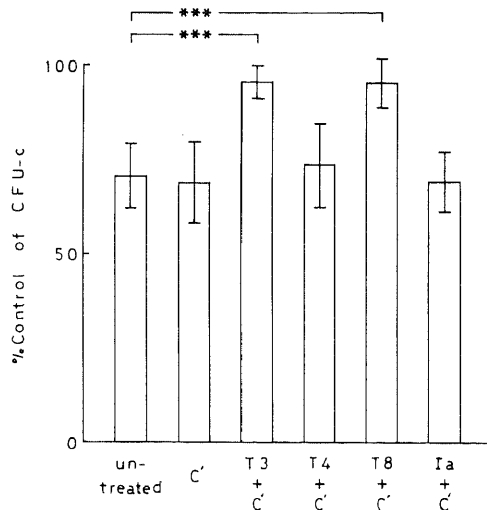


Fig. 12. Effect of pretreatments of ConA-activated cells with monoclonal antibodies on CFU-c suppression. ConA-activated cells were treated with OKT3, OKT4, OKT8 or OKIa1 antibody and rabbit complement before the cocultures with BMMNC. Each value represents the mean \pm SD of %control CFU-c in 8 experiments. *** $p < 0.005$

示すように、無処理および補体のみの処理では $70.6 \pm 8.5\%$, $68.9 \pm 10.7\%$ と CFU-c 形成に対する抑制が認められた。これに対して OKT3, OKT8 による処理では CFU-c 形成は $95.6 \pm 4.3\%$, $95.4 \pm 6.4\%$ と control とほぼ同程度まで回復し、抑制の解除が認められた。一方、OKT4, OKIa1 による処理では CFU-c 形成は $73.5 \pm 11.1\%$, $69.1 \pm 8.0\%$ となり抑制の解除は認められなかった。

X. コロニーのエステラーゼ 2 重染色

Con A 刺激細胞が顆粒球系幹細胞を強く抑制するのかわ、マクロファージ系幹細胞を強く抑制するのかわをはっきりさせるため、CFU-c assay の結果できたコロニーをエステラーゼ 2 重染色を施して検討した。顆粒球, granulocyte (以下 G と略す) コロニー, マクロファージ, macrophage (以下 M と略す) コロニー, G+M コロニーを別々に算定し、それぞれにできたコロニー数の %control をかけ合わせた結果を図 13 に示した。何も加えない control では G コロニーが 42.7%, M コロニーが 45.1%, G+M コロニーが 5.7% であった。Con A 非刺激細胞の場合との coculture の場合、それぞれ 41.1%, 47.2%, 5.7% であり、Con A 刺激細胞との coculture の場合、それぞれ 29.2%, 34.4%, 5.1% であった。したがって、Con A 刺激細胞添加により G コロニーは 13.4%, M コロニーは 10.7%, G+M コロニーは 0.6% それぞれ減少したこ

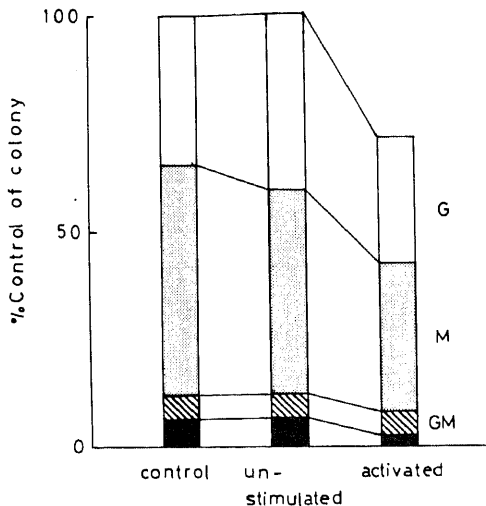


Fig. 13. Esterase double staining of CFU-c colony. Individual colonies were stained with esterase double stain of α -naphthyl butyrate and naphthol AS-D chloroacetate. Granulocyte (G), macrophage (M), and mixed (G+M) colonies were counted respectively.

とになったが、Gコロニー、Mコロニーの抑制率の程度に差はみられなかった。

考 察

Con A は *in vitro* 免疫グロブリン産生やリンパ球混合培養, mixed leukocyte culture (以下 MLC と略す) の系で抑制的に作用する suppressor cell を誘導するが²⁰⁾²⁸⁾²⁹⁾, 今回の検討で Con A 刺激細胞は顆粒球-マクロファージ系幹細胞である CFU-c に対しても抑制的に作用しうることが明らかとなった。この Con A 誘導 CFU-c/suppressor cell は、1) $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度の Con A と 48 時間培養で最も効率よく誘導される。2) T 細胞の性状を有する。3) 放射線感受性である。4) 抑制細胞と被抑制細胞との間で HLA の一致を必要としない。5) 抑制作用に液性因子が関与しているなどの点で、これまでに報告されてきた、いわゆる Con A 誘導 suppressor cell に一致する特徴を有するといえる²⁰⁾。さらにモノクローナル抗体による表面マーカーの検索では、Con A 誘導 CFU-c/suppressor cell が OKT3, OKT8 陽性であり、OKT4, OKIa1 陰性であった点も従来の報告に一致する所見である²⁹⁾³⁰⁾。Ia 抗原に関しては、Con A 誘導 CFU-c/suppressor cell は Ia 抗原陰性細胞であると考えられるが、48 時間の Con A 刺激には T 細胞の Ia 抗原獲得率は 5~10% 程にしかならないので³¹⁾, Ia 抗原陰性細胞だけでなく Ia 抗原陽性細胞も抑制的に働いている可能性も完全には否定できない。すなわち、抗 Ia 抗体と補体で処理しても、Ia 抗原陰性細胞が残存して抑制が解除されないという可能性である。この点に関してはさらに今後の検討が必要であろう。

造血調節機構に関与しうる T 細胞サブセットのモノクローナル抗体による検討はまだ詳細になされていないが、再不貧患者において OKT3, OKT8 陽性細胞が自己骨髓細胞の CFU-c を抑制している例が報告されており³²⁾, また OKT3, OKT4 陽性細胞が末梢血 BEU-E を促進するという報告もある³³⁾。今回の検討結果から、造血幹細胞に対しても OKT8 がサブレッサーとして働くと考えられる。モノクローナル抗体などでみる限り、免疫反応に働くサブレッサーと造血幹細胞に働くサブレッサーとは同一のサブセットに属すると考えられる。しかしながら、両者が全く同一でふたつの抑制作用を発揮しうるのか、あるいは異なる suppressor cell であるのかは不明であり、今後検討すべき問題と考えられる。

造血幹細胞抑制のメカニズムはまだ十分明らかにされていないが、今回の検討で抑制作用はマクロファージを介した抑制ではなく、液性因子を介したものと考

えられる。Coculture を行う前に骨髓細胞と Con A 刺激細胞とを preincubation しても抑制作用に変化はみられなかったことから、細胞相互の cell-to-cell interaction が抑制のために必須とは考えられず、細胞相互の接触がおこらない軟寒天培養の状態では、Con A 刺激細胞から抑制性液性因子が放出されているものと推測される。このような液性因子による抑制は培養上清添加の結果からも示唆される。培養上清中にはわずかに Con A を含んでいるため、Con A が骨髓中の T 細胞を刺激した結果抑制した可能性もあるが、2つの理由でこの可能性は少ないと考えられる。第1に培養上清中に含まれる Con A 濃度と等量の Con A を CFU-c の assay 系に直接加えても有意の抑制は認められず、培養上清中に含まれる Con A 以外の液性因子が CFU-c を抑制したと考えられる。第2に骨髓細胞中から T 細胞を除いた場合でも同様の抑制が認められ、Con A が骨髓中の T 細胞を刺激した結果、CFU-c 形成を抑制したのではないことが確認された。

マクロファージが Con A 誘導 suppressor cell による CFU-c 抑制に関与しうる可能性は今回の検討で否定された。マクロファージと造血幹細胞との関連はこれまで数多くの報告があり、CFU-c に対しては少量では促進的に働き、大量では抑制的に働くといわれており³⁴⁾、この抑制はインドメサシンによって解除され、プロスタグランジン E を介した抑制と考えられている³⁵⁾。また、この際抑制されるのは、CFU-c 中のマクロファージコロニーであると報告されている³⁶⁾。マクロファージは生体内において negative feed back の機能を有しており、CFU-c の分化増殖に重要である。この Con A 誘導 CFU-c/suppressor cell を adherent cell を除去した骨髓に加えて coculture したが、抑制率に有意差は認められず、adherent cell、すなわちマクロファージは関与していないことが確認された。

Con A 誘導 suppressor cell が CFU-c のうち G コロニー、M コロニーどちらを強く抑制するかをエステラーゼ 2 重染色で検討した結果では、G コロニー、M コロニーの間で有意差なく、どちらも同程度の抑制であった。前に述べたようにマクロファージの関与した抑制は M コロニーが主に抑制される³⁶⁾。一方、Verma ら³⁷⁾は BCG 刺激によるマクロファージの colony stimulating factor (以下 CSF と略す) 産生において、T 細胞は CSF 産生を促進するが、Con A 刺激 T 細胞は抑制的に作用し、その結果 CSF の低下によって G コロニーが主に抑制されるという成績を報告している。この成績はわれわれの今回の成績とは異なるが、その原因は実験方法が異なるためである。すなわち、一方は Con A 刺激 T 細胞の CSF 産生細胞を介した CFU-

c に対する間接作用であり、他方は CFU-c に対する直接作用である。

最近、Podesta ら³⁸⁾も、同様の検討を行っており、Con A 誘導 suppressor cell が CFU-c を抑制する成績を報告しているが、われわれの結果に比して抑制の程度が強いように思われる。この差の原因ははっきりしないが、Con A 誘導 suppressor cell 作製の培養条件すなわち使用する Con A 濃度が 50 $\mu\text{g/ml}$ と多いこと、培養時間が 18 時間と短いことなどの違いがあげられる。

また Con A 誘導 suppressor cell が赤芽球系幹細胞である BFU-E や CFU-E を抑制することも報告されている³⁹⁾⁴⁰⁾。さらに Con A だけでなく、phytohemagglutinin (PHA)、poke weed mitogen (PWM) などの mitogen 刺激や同種抗原刺激によっても CFU-c、CFU-E、BFU-E の形成を抑制する細胞が誘導されることも報告されている³⁹⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾。

再不貧患者の末梢血に認められる造血幹細胞抑制性細胞と異なり、これら正常人の細胞は何らかの刺激を受けてはじめて抑制性細胞が誘導される。しかし、Trok-Storb ら¹⁹⁾の成績によれば、刺激を加えない "resting" 状態の細胞でも造血幹細胞を抑制することが示されており、造血調節機構に関与するリンパ球には、何らかの刺激をうけて活性化されると抑制性作用を示す regulatory cell と活性化を特に必要とせずに調節機能を有するリンパ球とに区別されるかも知れない。本来、生体内で造血を調節しているのは後者のリンパ球と考えられるが、これらのリンパ球は何らかの刺激によって生体内で既に活性化されている可能性も否定できない。また、in vitro で誘導される抑制性細胞は in vivo で調節機能を有している regulatory cell の前駆細胞と推測することも可能であろう。

OKT モノクローナル抗体でみる限り、再不貧患者で認められた suppressor cell¹²⁾、Con A 誘導 suppressor cell、MLC 誘導 suppressor cell⁴²⁾ とともに OKT3、OKT8 陽性で、同一サブセットに属する。しかし放射線感受性に関しては、われわれは MLC 誘導 suppressor cell が放射線に resistant なことを見出ししており⁴²⁾、Con A 誘導 suppressor cell とは異なり別のサブセットと考えられ、造血調節性リンパ球にはいくつかの異なる subpopulations があると予想される。このように、生体内ではこれら種々のリンパ球が造血調節機構のコントロールをうけて、幹細胞の分化調節に関与しているのであると推測される。しかしながら、この造血調節機構の詳細についてはまだ不明な点も多く、造血異常を示す種々の疾患の病態を明らかにするためにも、今後のさらに詳細な検討が必要であろう。

結 論

造血幹細胞の分化増殖機構に関与するリンパ球の性質と、そのメカニズムを明らかにするため、suppressor T cellを誘導することで知られている Con A によって活性化されたリンパ球の CFU-c に及ぼす影響を検討し、以下の結論を得た。

1. 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の Con A との 48 時間培養で誘導される suppressor cell は CFU-c を dose dependent に抑制する。
2. 抑制活性は X 線 2000 rad 照射により消失し、Con A 誘導 CFU-c suppressor cell は放射線感受性である。
3. 抑制細胞は E ロゼット形成細胞分画に存在する T 細胞である。
4. OKT モノクローナル抗体による表面マーカーの検討では、抑制細胞は OKT3, OKT8 陽性であり、Ia 抗原陰性である。
5. 抑制活性発現のためには骨髓細胞と Con A 誘導 suppressor cell との間で HLA の一致を必要としない。
6. 抑制は preincubation により影響されず、抑制細胞作製時に得られた培養上清が CFU-c を dose dependent に抑制することから、抑制は主として液性因子によるものと考えられる。
7. 骨髓細胞からプラスチックシャーレ付着細胞を除いても抑制活性に有意差はなく、抑制にはマクロファージは関与していないものと思われる。
8. コロニー細胞のエステラーゼ 2 重染色では、マクロファージコロニー、顆粒球コロニーともに同程度の抑制をうけることが示された。

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第三内科服部絢一教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究の遂行にあたり終始御指導、御助言を賜りました同内科原田実根講師に深く感謝します。併せて種々の御協力をいただいた同内科免疫グループの諸先生方に感謝の意を表します。なお本研究の一部は、文部省科学研究費 (57440089, 58010031) ならびに厚生省特定疾患特発性造血障害調査研究班研究費によってなされたものであることを付記し、感謝の意を表します。

文 献

- 1) Pluznik, D. H. & Sachs, L.: The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **66**, 319-324 (1966).
- 2) Stephenson, J. R., Axelrad, A. A., Mcleod, D. D. L. & Shreeve, M. M.: Induction of colonies

of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **68**, 1542-1546 (1971).

- 3) Iscove, N. N. & Sieber, F.: Erythroid progenitors in mouse bone marrow detected by macroscopic colony formation in culture. *Exp. Hematol.*, **3**, 32-43 (1975).
- 4) Nakeff, A., Dick, K. A. & Van Noord, M. J.: Megakaryocytes in agar cultures of mouse bone marrow. *Ser. Haematol.*, **8**, 4-21 (1975).
- 5) Fauser, A. A. & Messner, H. A.: Granuloerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood and cord blood. *Blood*, **52**, 1243-1248 (1978).
- 6) Fauser, A. A. & Messner, H. A.: Identification of megakaryocytes, macrophage, and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblast. *Blood*, **53**, 1023-1027 (1979).
- 7) Kagan, W. A., Ascensao, J. A., Pahwa, R. N., Hansen, J. A., Goldstein, G., Valera, E. B., Incefy, G. S., Moore, M. A. S. & Good, R.: Aplastic anemia: Presence in human marrow cells that suppress myelopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 2890-2894 (1976).
- 8) Hoffman, R., Zanjani, E. D., Lutton, J. D., Zalusky, R. & Wasserman, L. R.: Suppression of erythroid-colony formation by lymphocytes from patients with aplastic anemia. *N. Engl. J. Med.*, **296**, 10-13 (1977).
- 9) Amare, M., Abdou, N. L., Robinson, M. G. & Abdou, N. I.: Aplastic anemia associated with bone marrow suppressor T-cell hyperactivity: Successful treatment with antithymocyte globulin. *Am. J. Hematol.*, **5**, 25-32, (1978).
- 10) Cline, M. J. & Golde, D. W.: Immune suppression of hematopoiesis. *Am. J. Med.*, **64**, 301-310 (1978).
- 11) Appelbaum, F. R. & Fefer, A.: The pathogenesis of aplastic anemia. *Sem. Hematol.*, **18**, 241-257 (1981).
- 12) Thomas, E. D., Storb, R., Giblest, E. R., Longpre, B., Welden, P. L., Fefer, A., Witherspoon, R., Clift, R. A. & Buckner, C. D.: Recovery from aplastic anemia following attempted marrow transplantation. *Exp. Hematol.*, **4**, 97-102 (1976).

- 13) Jeannet, M., Rubinstein, A., Pelet, B. & Kummer, H.: Prolonged remission of severe aplastic anemia after ALG pretreatment and HLA semi-incompatible bone marrow cell transfusion. *Transplant. Proc.*, **6**, 359-363 (1974).
- 14) Baran, D. T., Griner, P. F. & Klemperer, M. R.: Recovery from aplastic anemia after treatment with cyclophosphamide. *N. Engl. J. Med.*, **295**, 1522-1523 (1976).
- 15) Bagby, G. C., Goodnight, S. H., Mooney, W. M. & Richert-Boe, K.: Prednisone-responsive aplastic anemia: A mechanism of glucocorticoid action. *Blood*, **54**, 322-333 (1979).
- 16) Silingardi, V. & Torelli, U.: Recovery from aplastic anemia after treatment with antilymphocyte globulin. *Arch. Intern. Med.*, **139**, 582-583 (1989).
- 17) Bacigalupo, A., Podesta, M., Van Lint, M. T., Vimercati, R., Cerri, R., Rossi, E., Risso, M., Carella, A., Santini, G., Damasio, E., Giordano, D. & Marmont, A. M.: Severe aplastic anemia: Correlation of in vitro tests with clinical response to immunosuppression in 20 patients. *Br. J. Haematol.*, **47**, 423-433 (1981).
- 18) Gluckman, E., Devergie, A., Poros, A. & Degoulet, P.: Results of immunosuppression in 170 cases of severe aplastic anaemia. *Br. J. Haematol.*, **51**, 541-550 (1982).
- 19) Torok-Storb, B., Martin, P. J. & Hansen, J. A.: Regulation of in vitro erythropoiesis by normal T cells: Evidence for two T-cell subsets with opposing function. *Blood*, **58**, 171-174 (1981).
- 20) Friedman, S. M., Irigoyen, O. H. & Chess, J.: Regulation of human B-cell differentiation by T cell subclass. *Antibody Production in Man*, p 273-289, Academic Press, New York, 1979.
- 21) Harada, M., Ishino, C., Odaka, K., Matsue, K., Shiobara, S., Kodo, H., Mori, T., & Hattori, K.: Conditions for cryopreservation of human bone marrow for use in autologous transplantation. *Acta Haematol. Jpn.*, **45**, 754-762 (1982).
- 22) Pike, B. L., & Robinson, W. A.: Human bone marrow colony growth in agar-gel. *J. cell. Physiol.*, **76**, 77-84 (1970).
- 23) Burgess, A. W., Wilson, E. M. & Metcalf, D.: Stimulation by human placental conditioned medium of hemopoietic colony formation by human marrow cells. *Blood*, **49**, 573-583 (1977).
- 24) Taetle, R. & Royston, I.: Human T cell antigens defined by monoclonal antibodies. Absence of T65 on committed myeloid and erythroid progenitors. *Blood*, **56**, 943-946 (1980).
- 25) Reinherz, E. L. & Schlossman, S. F.: Regulation of the immune response-inducer and suppressor T-lymphocyte subsets in human beings. *N. Engl. J. Med.*, **303**, 370-373 (1980).
- 26) Li, C. Y., Lam, K. W. & Yam, L. T.: Esterase in human leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.*, **21**, 1-12 (1973).
- 27) Konwalinka, G., Glaser, P., Odavic, R., Bogusch, E., Schmalzi, F. & Braunsteiner, H.: A new approach to the morphological and cytochemical evaluation of human bone marrow CFU-c in agar cultures. *Exp. Hematol.*, **8**, 434-440 (1980).
- 28) Haynes, B. F. & Fauci, A. S.: Activation of human B lymphocytes. III. Concanavalin A-induced generation of suppressor cells of the plaque-forming cell response of normal human B lymphocytes. *J. Immunol.*, **118**, 2281-2287 (1977).
- 29) Reinherz, E. L. & Schlossman, S. F.: Con A inducible suppression of MLC: Evidence for mediation by the TH₂ T cell subset in man. *J. Immunol.*, **122**, 1335-1341 (1979).
- 30) Reinherz, E. L., Kung, P. C. Goldstein, G. & Schlossman, S. F.: A monoclonal antibody reactive with human cytotoxic/suppressor T cell subset previously defined by a heteroantiserum termed TH₂. *J. Immunol.*, **124**, 1301-1307 (1980).
- 31) Ko, H. S., Fu, S. M., Winchester, R. J., Yu, D. T. Y. & Kunkel, H. G.: Ia determinant on stimulated human T lymphocytes. Occurrence on mitogen and antigen activated T cells. *J. Exp. Med.*, **150**, 246-255 (1979).
- 32) Bagby, Jr. G. C.: T lymphocytes involved in inhibition of granulopoiesis in two neutropenic patients are of the cytotoxic/suppressor (T3⁺ T8⁺) subset. *J. Clin. Invest.*, **68**, 1597-1600 (1981).
- 33) 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).
- 34) Kurland, J. I., Broxmeyer, H. E., Pelus, L. M., Bockman, R. S. & Moore, A. S.: Role for

monocyte-macrophage-derived colony stimulating factor and prostaglandin E in the positive and negative feedback control of myeloid stem cell proliferation. *Blood*, **52**, 388-407 (1978).

35) Hanada, T., Nagasawa, T. & Abe, T.: Dual effect of monocyte-conditioned medium on *in vitro* hematopoiesis. *Exp. Hematol.*, **10**, 561-567 (1982).

36) 須田年生・三浦恭定・井島裕子・小沢敬也・元吉和夫・高久史麿: CFU-c, CFU-eとマクロファージ, リンパ球 (柴田・高久編) 造血幹細胞とその異常, 第1版, 44-52頁, 医歯薬出版, 東京, 1982.

37) Verma, D. S., Spitzer, G., Zander, A. R., Fisher, R., McCredie, K. B. & Dicke, K. A.: T lymphocyte and Monocyte-macrophage interaction in colony stimulating activity elaboration in man. *Blood*, **54**, 1376-1383 (1979).

38) Podesta, M., Frassoni, F., Van Lint, M. T., Piaggio, G., Marmont, A. & Bacigalupo, A.: Generation of CFU-c suppressor T cells *in vitro*. II. Effect of PHA, PWM and Con A on bone marrow and peripheral blood lymphocytes from healthy

donors. *Exp. Hematol.*, **10**, 256-262 (1982).

39) Talley, R., Rinehart, J. J. & Balcerzak, S. P.: Autologous and allogeneic suppressor lymphocyte inhibition of human erythroid colony forming unit proliferation. *Exp. Hematol.*, **10**, 505-513 (1982).

40) 近藤邦夫・尾高和亮・中尾真二・上田幹夫・塩原信太郎・末永孝生・石野千津子・服部純一・原田実根: リンパ球の造血調節への関与, 第2報 Con A 刺激リンパ球の BFU-e に及ぼす影響. 209頁, 第24回日本臨床血液学会総会抄録集, 東京, 1982.

41) Bacigalupo, A., Podesta, M., Mingar, M. C., Moretta, L., Piaggio, G., Van Lint, M. T., Durand, A. & Marmont, A. M.: Generation of CFU-c/suppressor T cells *in vitro*: An experimental model for immune-mediated marrow failure. *Blood*, **57**, 491-496 (1981).

42) 中尾真二・上田幹夫・近藤邦夫・尾高和亮・塩原信太郎・末永孝生・石野千津子・原田実根・服部純一: 活性化リンパ球の造血幹細胞に及ぼす影響—同種抗原刺激リンパ球による CFU-c の抑制. *医学のあゆみ*, **125**, 1012-1014 (1983).

Effects of Activated Lymphocytes on Hematopoietic Stem Cells — Suppression of Granulocyte-Macrophage Progenitor Cells by Concanavalin A Induced Suppressor T Cells Kazuaki Odaka, Department of Internal Medicine (III) (Director: Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — *J. J. J. Med. Soc.*, **92**, 699-711 (1983)

Key words: Concanavalin A induced suppressor cell, CFU-c, Monoclonal antibody

Abstract

Recent works suggest that the proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells may be regulated by immune-mediated mechanisms, especially by lymphocytes. To clarify the role of lymphocytes in the regulation of granulocyte-macrophage progenitor cells, colony forming unit in culture (CFU-c), lymphocyte activated by concanavalin A (Con A) were cocultured *in vitro* with bone marrow mononuclear cells in semisolid agar for CFU-c assay.

The result obtained revealed that Con A activated lymphocytes produced a dose dependent suppression of CFU-c. The Maximal suppression was observed when lymphocytes were stimulated with 10 μ g/ml of Con A for 48 hr. These suppressor cells were radiosensitive and did not require HLA-matching.

Further studies showed that the suppressive activity was mediated by humoral factor but not by either macrophage or cell-to-cell interaction with Con A-activated lymphocytes. By esterase double staining of colonies. Con A-activated cells were found to equally suppress both granulocyte colonies and macrophage colonies.

This suppression was abrogated by pretreatment of Con A-activated cells with OKT3 or OKT8 monoclonal antibody and complement, but not with OKT4 or OKIal antibody. These observations suggest that Con A-induced CFU-c/suppressor T cells are identical with those regulating immune response.