モノクローナル抗体(OK T4,OK T8)により識別されるヒトT細胞サブセットによる免疫グロブリン産生の調節：Nocardia Water Soluble Mitogen (NWSM)系とPokeweed Mitogen(PWM)系における検討

金沢大学十全医学会雑誌　第92巻　第1号　136－146（1983）

モノクローナル抗体（OKT4, OKT8）により識別されるヒトT細胞サブセットによる免疫グロブリン産生の調節

－Nocardia Water Soluble Mitogen (NWSM) 系とPokeweed Mitogen (PWM) 系における検討－

金沢大学医学部小児科学教室（主任：谷口　昂教授）

上　棚　直　人

（昭和58年1月28日受付）

ヒト末梢血T細胞をOKT 8 (suppressor/cytotoxic) およびOKT 4 (helper/inducer) 単クローン抗体と補体で処理することにより，それぞれ，OKT 4陽性（OKT 4^+）細胞，OKT 8陽性（OKT 8^+）細胞に富む細胞群に識別した．それぞれのT細胞サブセットのB細胞の免疫グロブリン産生細胞への分化調節能はNocardia water soluble mitogen（NWSM）とpokeweed mitogen（PWM）を用いる刺激培養系で比較した．B細胞による免疫グロブリンの合成，分泌は螢光抗体法による細胞質内免疫グロブリン保有細胞数とラテックス近赤外比濁法による培養液中の免疫グロブリン量の測定により評価した．それぞれのT細胞サブセットのヘルパー活性を見るため，B細胞にT細胞を添加し免疫グロブリン産生細胞数と免疫グロブリン量にて評価した．NWSM刺激系ではOKT 4^+，OKT 8^+サブセットのいずれもが免疫グロブリン産生細胞数，免疫グロブリン量ともに著名な増加を示した．PWM刺激系では，OKT 4^+サブセットのみがB細胞分化に対しヘルパー能を発揮し，OKT 8^+サブセットにはヘルパー能の作用はみられなかった．免疫グロブリン産生細胞数の減少，免疫グロブリン量の低下をうながすT細胞のサプレッサー活性を評価するためヘルパー細胞の存在のもとで観察した．PWM刺激系ではOKT 8^+サブセットは著名な免疫グロブリン産生細胞数あるいは免疫グロブリン量の減少を示したが，OKT 4^+サブセットにはそのような作用はなかった．一方NWSM刺激系ではOKT 8^+あるいはOKT 4^+サブセットどちらにおいても有意のB細胞分化の抑制はみられなかった．さらにOKT 4^+細胞とOKT 8^+細胞の細胞間相互作用によるB細胞分化の抑制作用を見るため，あらかじめPWMで刺激培養したT細胞を，NWSM刺激培養系に移し，その機能を解析した．未処理OKT 4^+細胞とOKT 8^+細胞の組み合せでは免疫グロブリン産生細胞数，免疫グロブリン量ともに減少はみられなかった．しかしPWM前処理OKT 4^+細胞とOKT 8^+細胞の組み合せでは明らかに免疫グロブリン産生細胞数，免疫グロブリン量の減少を示した．以上の結果はNWSMそれ自身にはT細胞のサプレッサー活性は誘導できないけれども，あらかじめPWMで前処理されたOKT 4^+細胞があればOKT 8^+細胞はB細胞分化を抑制すること，またこの系ではPWM前処理OKT 4^+細胞はOKT 8^+細胞による抑制作用の発現に必要であるということを示唆している．

Key words　Nocardia water soluble mitogen (NWSM), Pokeweed mitogen (PWM), 単クローン抗体，T細胞サブセット，T細胞間相互作用

Regulation of Immunoglobulin Production by Human T Cell Subsets Defined with Monoclonal Antibodies: －A Comparative Study in Nocardia Water Soluble Mitogen (NWSM) and Pokeweed Mitogen (PWM)-Stimulated Culture System－. **Naoto Uwadana,** Department of Pediatrics, (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University

ヒトB細胞は，抗原刺激やpokeweed mitogen（PWM）などのB細胞マイトジェンの刺激により増殖・分化し，免疫グロブリン産生細胞（immunoglobulin producing cell，以下Ig-PC）となる．B細胞のIg-PCへの分化過程には，マクロファージやT細胞が調節的に関与することが明らかとなっている[1)~3)]．B細胞マイトジェンを用いたin vitroの解析により，種々の免疫不全症[4)]やsystemic lupus erythematosus（SLE）[5)]などの自己免疫疾患の免疫反応答調節機構の異常が細胞レベルで観察されている．PWMは，B，T細胞の分裂を促進する作用があり，さらにB細胞をIg-PCへと誘導する[6)~9)]．PWM刺激によるB細胞の分化にはヘルパーT細胞の存在が必要であり，PWMはT cell dependent activator[10)11)]と考えられている．Nocardia opaca[12)13)]より得られる水溶性成分のNocardia water soluble mitogen（NWSM）は，ヒトB細胞の分裂，Ig-PCへの分化を促す作用がある[13)~15)]．NWSM刺激によるB細胞の分化にはT細胞の存在が必要でないと考えられていたが，B細胞分画よりT細胞をほぼ完全に除くとNWSM刺激による免疫グロブリン（immunoglobulin，以下Ig）産生は極めて低くなり，T細胞の添加により著名に増強されることが明らかとなった[14)16)]．また，PWMは新生児[17)~19)]やある種の免疫不全症[4)]のT細胞サプレッサー活性を強く誘導するが，NWSMにはその作用がなく現在ではNWSMはrelatively T cell independent B cell activator [13)~16)]と考えられるにいたっている．B細胞のIg-PCへの分化に及ぼすT細胞の調節能はPWM刺激系で広く検討されてきたが，NWSM刺激系での検討はほとんどない．

最近，KöllerとMilsteinら[20)21)]によって導入された細胞融合法の確立により，ヒトT細胞表面分化抗原に向けられたモノクローナル抗体が比較的容易に作り出されるようになった．Reinherz[22)23)]らによるOKTシリーズモノクローナル抗体はヒトT細胞の機能を異にするサブセットの識別を可能にし，T細胞サブセット機能の解析がより詳細に行なわれるようになった．これらOKTシリーズモノクローナル抗体のうちOKT 4はhelper/inducer T細胞を，OKT 8はsupperssor/cytotoxic T細胞を識別するとされている．OKT 4陽性細胞は末梢T細胞の50～60%を占め，PWM刺激ではB細胞のIg産生への分化を増強さす機能をもっている[24)25)]．一方OKT 8陽性細胞は，末梢T細胞の20～30%を占め，PWM刺激によるIg産生に対してはヘルパーとしての作用はなく，サプレッサー細胞として働くことが知られている[26)]．さらに，OKT 8陽性細胞のサプレッサー活性発揮にはOKT 4陽性細胞の存在が必要であることが明らかとなった[27)28)]．本研究では，OKTシリーズモノクローナル抗体を用いて，成人末梢血からOKT 4陽性細胞及びOKT 8陽性細胞を分離，NWSM及びPWM刺激系でのIg産生に及ぼすT細胞サブセットの調節能について比較検討した．同時に，PWMで前処理したT細胞サブセットをPWM刺激培養系に移し，その機能の解析も行った．

対象および方法

1．対象および方法

健康成人末梢血は，当教室の男子医局員より採取した．静脈血よりヘパリン加採血，リン酸緩衝液生理食塩水（phosphate-buffered salin；PBS）にて2倍に希釈し，これをFicoll-Hypaque Lymphprep, Nyegaard & Co. Oslo, Norway）上に静かに重層した．4°C，400 G 20分間遠心後，中間層に得られたリンパ球をマイクロピペットで採取，PBSにて3回洗浄し，RPMI 1640培地（GIBCO）に再浮遊した．トリパンブルー法による生細胞率は98%以上であった．

2．T細胞，B細胞の分離

T細胞は，未分画リンパ球をノイラミニダーゼ処理ヒツジ赤血球（以下N-SRBC）でEロゼット形成後，Ficoll-Hypaque比重遠心を行い，pelletよりT細胞に富む分画として分離した．B細胞は，中間層よりマイクロピペットにて採取した．

すなわち，N-SRBCは，洗浄したSRBC（1×10^9/ml）にPBSにて30倍希釈したノイラミニダーゼ（Behringwerke）10単位/mlを加え，37°C，30分間処理後，PBSで3回洗浄，2×10^8/mlに調整し使用した．リンパ球浮遊液（1×10^7/ml）とN-SRBC（2×10^8/ml）をそれぞれ数本の試験管に0.5 mlずつ分注し，さらにウシ胎児血清（fetal bovine serum：以下FBS，GIBCO，56°C，30分間非動化後，37°Cおよび4°CにてSRBCで吸収）を0.5 mlを加え，200 G，5分間遠心し，その後60分間室温にて静置した．静置後，2～3本の試験管分のpelletを1本として再浮遊し，Ficoll-Hypaque上に重層後，4°Cで400 G，20分間遠心し，中間層とpelletに分離した．中間層より得た非ロゼット形成細胞をPBSで2回洗浄後，さらにもう一度同様の方法でロゼット形成を行い，再びFicoll-Hypaque比重遠心した．

遠心後，中間層の非ロゼット形成細胞を採取し，この細胞をB細胞として実験に用いた．B細胞中のEロゼット形成（以下N-RFC）は0.5%以下であり，30～48%はエステラーゼ陽性の単球であった．一方，T細胞に富むpelletは，10%FBSを含むRPMI 1640で静かに再浮遊した後，再びFicoll-Hypaque比重遠心を行ない，さらにT細胞に富むpelletとした．遠心後，

pellet に 0.84%NH_4Cl-トリス緩衝液を加え，混入してきた．N-SRBC を完全に溶血させた後，PBS にて 2 回洗浄，RPMI 1640 培地に再浮遊した．このように得られた T 細胞は，94～98 %以上が N-SRBC と E ロゼットを形成し，螢光抗体法にて算定した細胞表面 Ig 陽性細胞の混入は 0,5%以下であった

4．モノクローナル抗体による T 細胞サブセットの分離

ヒト T 細胞サブセットを分離するため，モノクローナル抗体はオルソ社製 OKT 4 および OKT 8 を使用した．モノクローナル抗体と補体を用いた細胞融解法により，T 細胞の内お互いに相反するサブセットを除去し，OKT 4 陽性あるいは OKT 8 陽性細胞に富む分画を得た．すなわち，RPMI 1640 で 3～5×10^6/ml に再浮遊した未分画 T 細胞に，1/200 の濃度の OKT 4 あるいは OKT 8 を加え 30 分間室温にて静置する．さらに，補体として－80°Cで凍結してある家兎血清を細胞浮遊液に 1/10 量加え，37°C45 分間反応させた．反応後，RPMI 1640 にて 2 回洗浄，死細胞等による凝集塊を除去して，RPMI 1640 で再浮遊した．同様の操作を 2 回繰り返した．

螢光標識抗マウス IgG ヤギ血清（以下，G/M FITC Cappel Laboratories, Inc., Cochranville, PA）使用による間接螢光抗体法で検定すると，OKT 4 で処理した分画中には 80～88%が OKT 8 陽性細胞，OKT 4 陽性細胞は 3 %以下であった．一方 OKT 8 で処理した分画中には OKT 4 陽性細胞は 85～93%，OKT 8 陽性細胞は 3 %以下であった．このようにして得られた細胞の内 OKT 8 で処理したものを OKT 4 陽性細胞，OKT 4 で処理したものを OKT 8 陽性細胞として使用した．

5．培養条件

細胞培養は，いずれも，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 μg/ml)，10%非動化 FBS を含む RPMI 1640 培地にて行い，13×100 mm のプラスチック培養試験管（No. 2027, Falcon Plastic, Oxnard, CA）中で培養した．PWM（GIBCO）は 5 μl/ml の至適濃度で，NWSM は Dr. R. Ciorbaru (Paris-Sad, Orsay, France) より提供された Lot 1460 を 50 μg/ml の至適濃度で培養に用いた．NWSM の滅菌は，80°Cで 3 分間加熱後，2 分間ソニケーター処理にて行った．培養は炭酸ガス培養恒温器（37°C, 5%CO_2）中で 7 日間培養した．

6．PWM による T 細胞サブセットの処理

10%FBS 加 RPMI 1640 にて 1×10^6/ml に浮遊した OKT 4 陽性細胞及び OKT 8 陽性細胞に，あらかじめ PWM を 5 μl/ml を加え 12 時間培養した．培養後，RPMI 1640 培地にて，300 G，10 分間 2 回洗浄し，このようにして得られた T 細胞サブセットを PWM 前処理細胞として使用した．

7．免疫グロブリン産生細胞の検出法

B 細胞より PWM 及び NWSM で誘導される Ig-PC の検出は，Kearny[30]らの方法に従い，螢光抗体法で細胞質内 Ig を染色することにより行った．培養後，回収された生細胞数を算定，PBS にて 2 回洗浄，細胞を PBS で 1×10^6/ml に調整し，スライドグラス上に塗沫，直ちに冷風下で乾燥した．その後，5 %氷酢酸加エタノールで－20°C, 20 分間固定し，PBS でスライドグラスを十分洗浄後，FITC 標識家兎抗ヒト Ig 血清（polyvalent; IgM＋IgG＋IgA, Behringwerke, A. G., PBS で 20 培に希釈して使用）で 30 分間染色した．細胞内 Ig 陽性細胞は，螢光顕微鏡下で少なくとも 500 ケ以上の細胞を観察し，その中の百分率を算定した．Ig-PC 数は，細胞内 Ig 陽性細胞の比率と回収された生細胞数より算出し，絶対数として表わした．

8．培養上清免疫グロブリン量の測定

Ig 産生細胞が培養液中に分泌する Ig 量の測定のため，7 日間培養した細胞の培養上清を細胞の螢光抗体法を行う前に，200 G，5 分間遠心で回収し，回収された上清は－20°Cにて保存した．測定は，IgM, IgG に関して行ない，沢井，右田ら[31][32]が開発したラテックス近赤外比濁法（latex photometric immunoassay 以下 LPIA）を使用した．LPIA は均一な直径のラテックス粒子に純度の高い抗体を感作しておき，抗原を含む試料に加えて抗原抗体反応を起こさせ，ラテックスが凝集する際に近赤外部（0.9 μm）の光の透過度が低下することを利用して抗原量を定量する方法である．培養上清中の Ig 量の測定にあたっては，Ig 量の標準曲線の作製を行い，測定するリンパ球上清の LPIA より得られた値を plot することより求められた．Ig 量の標準曲線を作成するために，多用途日本人標準血清（QS, Hoechst Japan）150 μl を 10%FBS 加 RPMI 1640 培養液で倍々希釈し，2^{19}倍までの希釈系列を作った．それぞれ 0.6 ml と 0.1%ラテックス試薬（抗ヒト IgM, IgG 家兎抗体感作）1 ml をキュベットに入れ，直ちに，円形スターラーで攪拌しながら 0.9 μm の波長の光の透過度の変化を測定した．B 細胞のみあるいは B 細胞と OKT 4 陽性細胞の組み合せの培養上清は 2 倍希釈，それ以外の培養上清は 3 倍希釈とし，0.6 ml ずつ IgM, IgG の測定に供した．この方法で IgM は 50～10,000 ng/ml, IgG は 10～1,000 ng/ml の範囲内の測定が可能である（図 1，2）

成　　績

1．T 細胞サブセットの B 細胞分化に及ぼすヘルパ

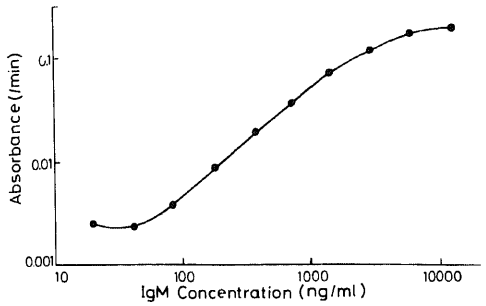

Fig. 1. Standard curve for IgM determination by the rate method of latex photometric immunoassay (LPIA).

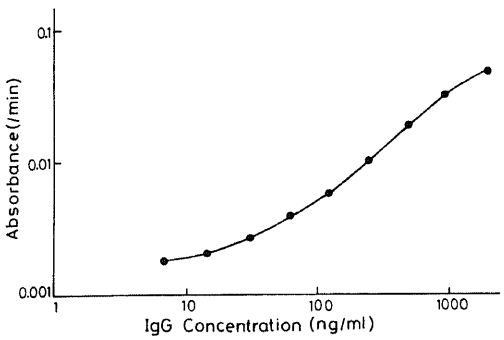

Fig. 2. Standard curve for IgG determination by the rate method of latex photometric immunoassay (LPIA).

一能

一定の濃度：5×10^5のB細胞に$1.25\sim10\times10^5$ OKT 4陽性細胞あるいはOKT 8陽性細胞を加え，PWM及びNWSM存在下で7日間培養し，出現するIg-PC数の算定と培養上清中IgM，IgGにつき比較検討した．図3，4のA，Bに示すようにB細胞単独培養ではNWSM及びPWMいずれを添加しても有意のIg-PCの出現及びIg(以下出てくるIgはすべてIgM，IgGを意味する)産生はみられない．図3，4のAに示すようにNWSM刺激系ではB細胞にOKT 4陽性細胞あるいはOKT 8陽性細胞を添加すると，いずれも添加量に比例してIg-PC数，Ig産生量は増加した．このような免疫グロブリン産生補助効果はOKT 4陽性細胞がOKT 8陽性細胞に比べIg-PC数では2倍，Ig産生量では3倍以上の有意の差を認めた．他方，図3，4のBに示すようにPWM刺激系ではOKT 4陽性細胞のみがB細胞の分化に対してヘルパー活性をもっていた．OKT 4陽性細胞$1.25\sim2.5\times10^5$の添加では，Ig-PC及びIg産生量は増加を示すが，2.5×10^5以上のOKT 4陽性細胞添加ではIg-PC及びIg産生量は減少傾向を示した．OKT 8陽性細胞の添加では有意なIg-PC数及びIg産生量はみられなかった．

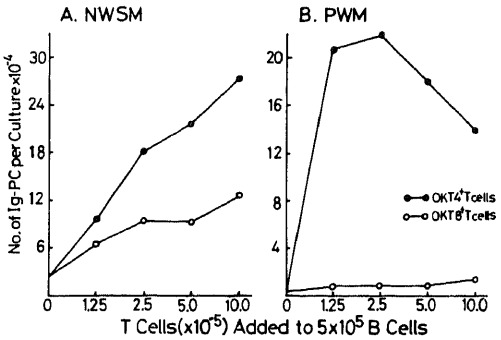

Fig. 3. Ability of OKT4$^+$ or OKT8$^+$ cells to augment NWSM-or PWN-induced B cell differentiation. 5×10^5 B cells were cultured alone or with graded numbers of OKT4$^+$ (●–●) or OKT8$^+$ (○–○) in the presence of NWSM or PWN for 7 days. Subseqently, cultures were harvested, and the number of Ig-PC per culture was enumerated.

2．T細胞サブセットのB細胞分化抑制効果

2.5×10^5 B細胞と2.5×10^5 OKT 4陽性細胞の組み合せを作成，この組み合せにOKT 4陽性細胞あるいはOKT 8陽性細胞をそれぞれ$1.25\sim5.0\times10^5$加え，PWM及びNWSM存在下で7日間培養しIg-PC数及びIg産生量につき比較検討した．図5，6のBにみられるようにPWM刺激系ではOKT 8陽性細胞を添加するとIg-PC数及びIg産生量は減少する．OKT 4陽性細胞添加では有意な低下はみられなかった．一方，5，6のAに見られるようにNWSM刺激系ではOKT 4陽性細胞及びOKT 8陽性細胞いずれの添加によっても抑制はみられず，むしろ増加する傾向にあった．

3．NWSM刺激により誘導されるB細胞分化に果たすPWM前処理T細胞サブセットの効果

細胞濃度：1×10^6/mlのOKT 4陽性細胞とOKT 8陽性細胞をあらかじめPWMで12時間培養しPWM前処理細胞を作成，未処理B細胞と組み合わせNWSM存在下で7日間培養，Ig-PC数とIg産生量につき検討した．表1，2にみられるようにあらかじめPWMで前処理したOKT 4陽性細胞とB細胞の組み合せた場合のIg-PC数及びIg産生量も，未処理OKT 4陽性細胞とB細胞の組み合せの時に比べ有意の差はなかった．しかしそれぞれの組み合せに未処理OKT 8陽性細胞またはPWM前処理OKT 8陽性細胞いずれかを添加することより，PWM前処理OKT 4陽性細胞との培養系では著名にIg-PC数及びIg産生量は減少した．一方未処理OKT 4陽性細胞との培養系ではIg-PC数及びIg産生量には変化はみられなかった．この

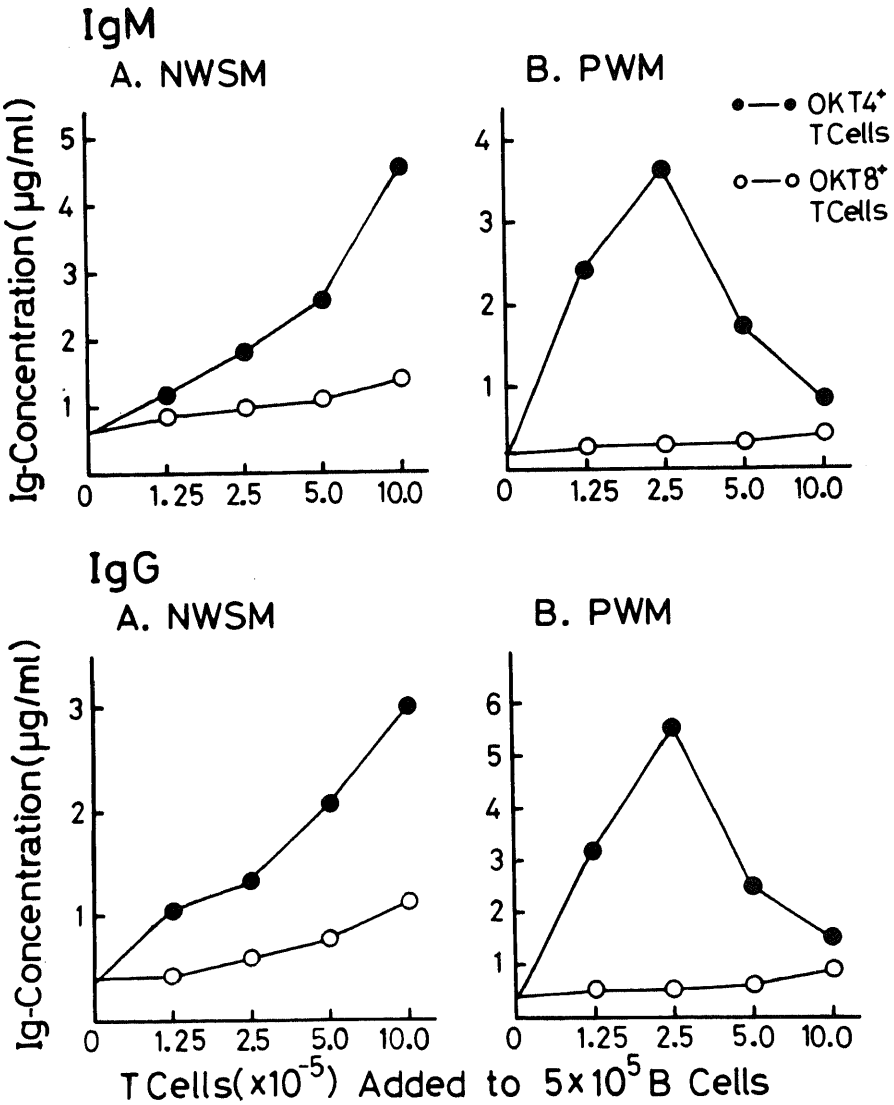

Fig. 4. Experimental conditions were same as shown in Fig. 3. Ability of OKT4⁺ or OKT8⁺ cells in NWSM- or PWN-induced production of immunoglobulin by B cells.

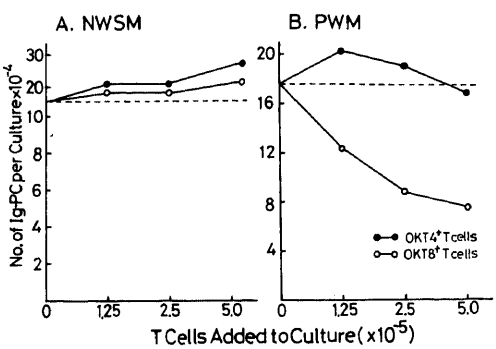

Fig. 5. Effect of added OKT4⁺ or OKT8⁺ cells on the generation of Ig-PC by B plus OKT4⁺ cells in NWSM- or PWN-stimulated cultures. The standard culture contained 2.5×10^5 B cells and 2.5×10^5 OKT4⁺ cells in addition to NWSM or PWN. To this system were added graded numbers of OKT4⁺ (●—●) or OKT8⁺ (o—o). After 7 days, cultures were harvested, and the number of Ig-PC per culture was enumerated.

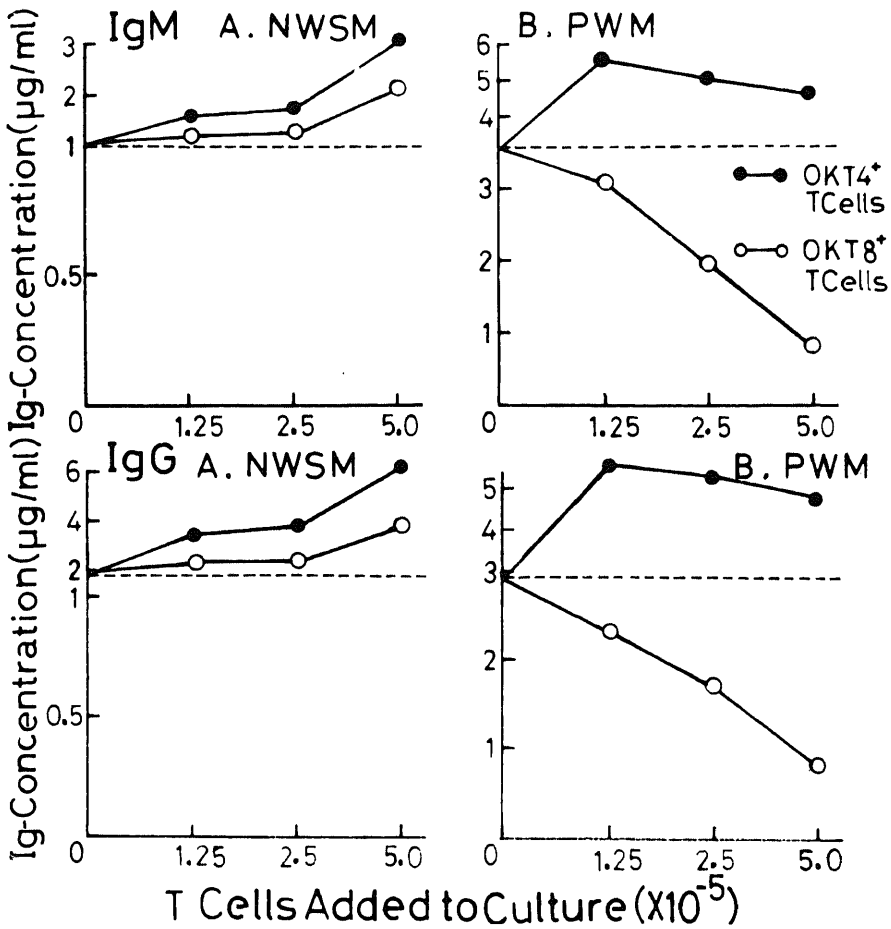

Fig. 6. Experimental conditions were same as shown in Fig. 5. Effect of added OKT4$^+$ cells or OKT8$^+$ cells on the immunoglobulin production by B plus OKT4$^+$ cells in NWSM- or PWM-stimulated cultures.

Table 1. OKT8$^+$ cells suppress NWSM-induced B cell differentiation in collaboration with PWM-prestimulated OKT4$^+$ cell

Cell combination[a]	Added OKT8$^+$ cells	No. of Ig-PC per Culture $\times 10^{-4}$	p Values[b]
B + untreated OKT4$^+$ cell	None	14.0±1.9	–
	Untreated	13.8±1.4	NS[c]
	PWM-prestimulated	12.8±2.0	NS
B ± PWM-prestimulated OKT4$^+$ cells	None	14.2±1.7	NS
	Untreated	6.0±0.5	0.01
	PWM-prestimulated	6.2±0.4	0.01

[a] The standard cultures contained 2.5×10^5 B cells and 2.5×10^5 OKT4$^+$ cells, untreated or PWM-prestimulated, in addition to NWSM. To these systems were added 5×10^5 OKT8$^+$ cells, untreated or PWM-prestimulated. After 7 days, cultures were harvested, and the number of Ig-PC per culture was determined. Data represent the mean (±SEM) of five separate experiments.
[b] Compared with control cultures containing B and untreated OKT4$^+$ cells.
[c] NS, not significant.
[d] Cells were preincubated with PWM for 12 hr 37°C.

Table 2. OKT8$^+$ cells suppress NWSM-induced immunoglobulin production in collaboration with PWM-prestimulated OKT4$^+$ cells[a]

Cell combination	Added OKT8$^+$ cells	Ig-Concentration (ng/ml)[b]	
		IgM	IgG
B+untreated OKT4$^+$ cell	None	1,200	630
	Untreated	1,140	560
	PWM-prestimulated	930	540
B+PWM-prestimulated OKT4$^+$ cells	None	1,395	550
	Untreated	760	250
	PWM-prestimulated	780	280

[a] All others experimental conditions were same as shown in Table 1.
[b] Ig amounts (ng/ml) of co-culture supernatant were evaluated by latex photometric immunoassay.

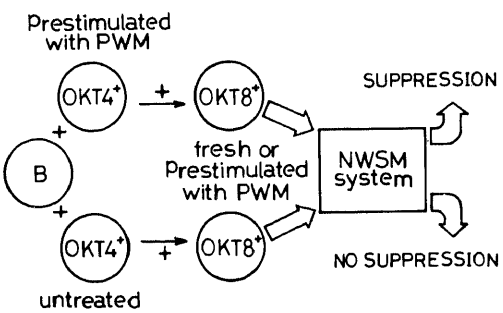

Fig. 7. Model showing possible cellular interaction between T cell subsets in the development of suppressor activity.

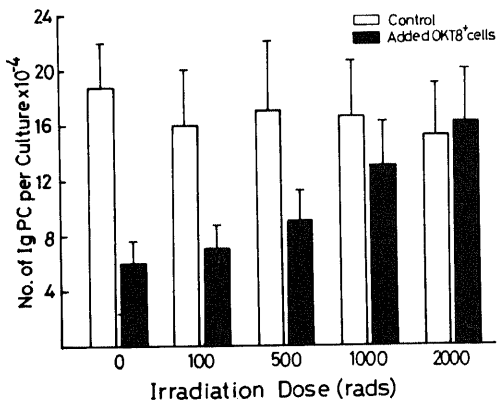

Fig. 8. Irradiation of PWN-prestimulated OKT4$^+$ cells sbrogates suppression of NWSM induced B cell differentiation mediated by OKT8$^+$ cells. The control culture (□) contained 2.5×10^5 B cells and 2.5×10^5 PWN-prestimulated OKT4$^+$ cells in addition to NWSM. PWN-prestimulated OKT4$^+$ cells were irradiated with various doses (100 or 2,000rads) befor culture. To this system were added 5×10^5 untreated OKT8$^+$ cells (■). After 7 days, cultures were harvested, and the number of Ig-PC per culture was enumerated. Data represent the mean (±SEM) of five separate experiments.

結果はNWSM刺激B細胞分化系においても，PWM前処理OKT 4陽性細胞が存在すればOKT 8陽性細胞添加によりB細胞のIg-PCへの分化の抑制がみられることを示す．つまり図7に示すように，OKT 8陽性細胞のサプレッサー活性の誘導にはOKT 4陽性細胞が主たる役割を演じており，OKT 4陽性細胞がPWMで刺激されていれば，OKT 8陽性細胞のサプレッサー活性が誘導され，NWSM刺激によって導かれるB細胞のIg-PCへの分化もまた抑制される事を示す．

さらに図7に見られるようにサプレッサー活性誘導におけるインデューサーとして働いているPWM前処理OKT 4陽性細胞の放射線感受性を検討してみた．図8にみられるようにあらかじめ種々の量の放射線照射をしたPWM前処理OKT 4陽性細胞とB細胞を組み合せ，NWSM刺激した場合の免疫グロブリン産生細胞数をコントロールとした．このコントロールの組み合せにOKT 8陽性細胞を添加することによってみられるB細胞分化抑制がどう変わるかみた．ほぼ完全に2,000 Radの放射線照射てOKT 8陽性細胞によるB細胞分化抑制は消失した．これはPWM前処理OKT 4陽性細胞が放射線感受性の細胞であることを示している．

考　　察

本研究はモノクローナル抗体によって識別されるヒトT細胞サブセットによるB細胞分化の調節をNWSM刺激系とPWM刺激系において比較検討した．PWMによって誘導されるB細胞のIg-PCへの分化はT細胞の作用により調節を受ける現象であることは多

く報告のあるところである[6)~11)]．またヒトB細胞はNWSM刺激でIgM，IgG，IgAのIg-PCへ分化することが知られているが，最近ではNWSMによって導かれるB細胞の免疫グロブリン産生が，T細胞の添加により増強されることも明らかになった[14)~16)]．すでに示したようにT細胞を取り除いたB細胞に富んだ分画に対するNWSMとPWMのIg-PC，Ig産生はいずれもわずかであったが，2つの刺激系でのB細胞分化のT細胞に対する依存度に関して明確な違いを見出した．PWM刺激では他の報告に見られる[24)~27)]ようにOKT 4陽性細胞によりB細胞の分化はヘルパー活性を示した．ところがこのようなヘルパー活性はT細胞の増加とともに抑制傾向を示した．このことは他の報告に見られる観察と一致するものであった[27)33)]．他方PWM存在下でのOKT 8陽性細胞の添加では著名なヘルパー活性は示さなかった．PWM刺激系と対照的にNWSM刺激系ではOKT 4陽性細胞あるいはOKT 8陽性細胞どちらにおいてもB細胞の分化は増強効果を示し，この増強効果はOKT 4陽性細胞のほうがOKT 8陽性細胞を上回っていた．そしてこのような増強効果はPWM刺激でみられたような傾向はなくT細胞増加と共に直線的にIg-PC数及びIg産生量は増加傾向を示した．この事についてBonaら[14)]もNWSM存在下で免疫グロブリン産生はB細胞に対するT細胞の比率を増していくことにより強くみられることを報告している．

さらにPWM刺激系におけるT細胞サブセットのB細胞分化への抑制効果を明らかにするため，B細胞とOKT 4陽性細胞の組み合せにOKT 8陽性細胞及びOKT 4陽性細胞を加え混合培養すると，OKT 8陽性細胞がOKT 4陽性細胞の存在のもとでB細胞分化を強く抑制した．この結果はReinherzら[26)]，Thomasら[27)]の報告と同様の結果である．またOKT 4陽性細胞存在でのOKT 4陽性細胞はB細胞の分化を増強させた．PWM刺激系と対照的にNWSM刺激系でのB細胞分化はOKT 4陽性細胞またはOKT 8陽性細胞どちらの添加においても抑制効果はみられなかった．この結果はBonaら[14)]の行った実験結果と一致するものであった．このような結果より抑制T細胞のprecursorの活性化に関してはPWMには見られるが，NWSMではそのような作用がないということが示唆された．

そこであらかじめPWMで誘導されたT細胞サブセットをNWSM存在下で未処理T細胞サブセットと混合培養し，B細胞分化に与える影響を検討した．その結果，B細胞と未処理OKT 4陽性細胞あるいはPWM前処理OKT 4陽性細胞による培養では免疫グロブリン産生に差はなかった．しかし，B細胞と未処理OKT 4陽性細胞の組み合せに未処理あるいはPWM前処理OKT 8陽性細胞を添加した時よりも，B細胞とPWM前処理OKT 4陽性細胞の組み合せに同様のOKT 8陽性細胞を添加したほうが著名な免疫グロブリン産生の抑制を示した．このような抑制はPWM前処理OKT 4陽性細胞を2,000 Radの放射線照射することによりほぼ完全に消失した．以上のことよりOKT 8陽性細胞によって誘導されるB細胞分化の抑制には少なくともPWMのような刺激によってOKT 4陽性細胞が活性化されていることが必要であることが示唆され，このPWMで活性化されたOKT 4陽性細胞は放射線感受性であることがわかった．この事について，Thomasら[27)]はPWM刺激系でのB細胞分化のOKT 8陽性細胞による抑制作用には放射線感受性のOKT 4陽性細胞の存在が必要であると報告している．

これまでの実験結果よりin vitroでのB細胞分化の抑制作用にはOKT 4陽性細胞とOKT 8陽性細胞のT細胞の細胞間相互作用が必要であり，effector細胞としてのOKT 8陽性細胞はinducer細胞としてのOKT 4陽性細胞の存在があって初めてB細胞分化の抑制作用を示すことがわかった．

結　　論

relatively T cell independent B cell activatorであるNWSMを使用し，T cell dependent B cell activatorであるPWMと，モノクローナル抗体OKT 4とOKT 8により識別されるヒトT細胞サブセットによるB細胞分化につき比較検討し，以下の成績を得た．

1．T細胞サブセット添加による，マイトジェンの比較検討を行った所，NWSM刺激系ではOKT 4^+細胞及びOKT 8^+細胞どちらの添加においても免疫グロブリン産生は増強した．他方，PWM刺激系ではOKT 4^+細胞の添加では免疫グロブリン産生は増強したが，OKT 8^+細胞添加では著名な免疫グロブリン産生はみられなかった．

2．NWSMあるいはPWM刺激系におけるT細胞サブセットの抑制効果を検討した所，PWM刺激系では，OKT 4^+細胞添加により免疫グロブリン産生は増強し，OKT 8^+細胞添加では著明な免疫グロブリン産生の抑制を示した．PWMとは対照的にNWSM刺激系では，OKT 4^+細胞及びOKT 8^+細胞ともに免疫グロブリン産生の増強，抑制はみられなかった．

3．PWM前処理T細胞サブセットをNWSM培養系に移しB細胞分化を評価した．B細胞とPWM前処理OKT 4^+細胞の組み合せにOKT 8^+細胞を添加すると，B細胞と未処理OKT 4^+細胞の組み合せにOKT 8^+細胞を加えた時より免疫グロブリン産生は著名に抑制された．またこのような抑制はPWM前処理OKT 4^+

細胞を放射線(2,000 Rad)照射することにより完全に消失した.

以上PWMと異なりNWSMはヒトT細胞サブセットのサプレッサー活性を誘導できないが,OKT 8⁺サブセットはNWSM刺激系においてもPWMで前処理したOKT 4⁺サブセットの存在下で免疫グロブリン産生に対して抑制的に働く.このことはOKT 8⁺細胞はOKT 4⁺細胞との細胞間相互作用によってはじめてそのサプレッサー機能を発揮すると考えられる.また細胞間相互作用には少なくともOKT 4⁺細胞がPWMによる刺激によって活性化されることが必要と考えられた.

謝　辞

稿を終わるにあたり,終始激励し,かつ御指導と御校閲を賜った恩師谷口昻教授に深謝致します.

また直接御指導頂きました宮脇利男先生はじめ,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感謝致します.

なお,本論文の要旨は,第12回日本免疫学会総会(1982)において発表した

文　献

1) **Rosenstreich, D. L., Farr, J. J. & Dougherty, S. S.**: Absolute macrophage dependency of T lymphocyte activation by mitogens. J. Immunol., **116**, 131-139 (1976).

2) **Seeger, R. C. & Oppenheim, J. J.**: Synergistic interaction of macrophages and lymphocytes in antigen-induced transformation of lymphocytes. J. Exp. Med., **132**, 44-65 (1970).

3) **Mookerjee, B. K.**: Functional characteristics of monocytes. I. Essential role in the transformational response of human blood lymphocytes to phytomitogens. Transplantation., **23**, 22-28 (1977).

4) **Waldmann, T. A., Broder, S., Blaese, R. M., Durm, M., Blackman, M. & Strober, W**: Role of suppressor T cells in pathogenesis of common variable hypogammaglobulinemia. Lancet., **2**, 609-613 (1974).

5) **Fauci, A. S., Steinberg, A. D., Haynes, B. F. & Whalen, G.**: Immunoregulatory aberrations in systemic lupus erythematosus. J. Immunol., **121**, 1473-1479 (1978).

6) **Lipsky, P. E., Ginsburg, W. W., Finkelman, F. D. & Ziff, M.**: Control of human lymphocytes responsiveness: Enhanced suppressor T cell activity after in vitro. J. Immunol., **120**, 902-910 (1978).

7) **Siegal, F. P. & Siegal, M.**: Enhancement by irradiated T cells of human plasma cell production: Dissection of helper and suppressor function in vitro. J. Immunol., **118**, 642-647 (1977).

8) **Morreta, L., Webb, S. R., Grossi, C. E., Lydard, P. M. & Cooper, M. D.**: Functional analysis of two human T cell subpopulation: Help and suppression of B cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG. J. Exp. Med., **146**, 184-200 (1977).

9) **Fauci, A. S., Pratt, K. R. & Whalen, G.**: Activation of human B lymphocytes. Ⅷ. Differential radiosensitivity of subpopulations of lymphoid cells involved in the polyclonally-induced PFC responses of peripheral blood B lymphocytes. Immunology., **35**, 715-720 (1978).

10) **Keightley, R. G., Cooper, M. D. & Lawton, A. R.**: The T cell dependence of B cell differentiation induced by pokeweed mitogen. J. Immunol., **117**, 1538-1544 (1976).

11) **Fauci, A. S., Pratt, K. R. K. & Whalen, G.**: Activation of human B lymphocytes. II. Cellular interactions in the PFC response of human tonsillar and peripheral blood B lymphocytes to polyclonal activation by pokeweed mitogen. J. Immunol., **117**, 2100-2104 (1976).

12) **Ciorbaru, R., Adam, A., Petit, J. F., Lederer, E., Bona, C. & Chedid, L.**: Isolation of mitogenic and adjuvant active fractions from various species of Nocardiae. Infect. Immun., **11**, 257-264 (1975).

13) **Brochier, J., Bona, C., Ciorbaru, R., Revillard, J. P. & Chedid, L.**: A human T-independent B lymphocyte mitogen extracted from Nocardia opaca. J. Immunol., **117**, 1434-1439 (1976).

14) **Bona, C., Broder, S., Dimitriu, A. & Waldmann, T. A.**: Polyclonal activition of human B lymphocytes by Nocardia water soluble mitogen (NWSM). Immunol. Rev., **45**, 69-92 (1979).

15) **Lêthibichthuy, Ciorbaru, R. & Brochier, J.**: Human B cell differentiation. I. Immunogloblin synthesis induced by Nocardia mitogen. Eur. J. Immunol., 8, 119-123 (1978).

16) **Naganoki, T., Miyawaki, R., Ciorbaru, R., Yachie, A., Uwadana, N., Moriya, N. & Taniguchi, N.** Maturation of B cell differentiation ability and T cell regulatory function daring child growth assessed in a Nocardia water soluble

mitogen-driven system. J. Immunol., **126**, 2015-2019 (1981).

17) **Hayward, A. R. & Lydyard, P. M.**: Suppersion of B lymphocyte differentiation by newborn T lymphocytes with and Fc receptor for IgM. Clin. Exp. Immunol., **34**, 374-378 (1978).

18) **Miyawaki, T., Seki, H., Kubo, M. & Taniguchi, N.**: Suppressor activity of T lymphocytes from infants assessed by co-culture with unfractionated adult lymphocytes in the pokeweed mitogen system. J. Immunol., **123**, 1092-1096 (1979).

19) **Tosato, G., Magrath, I. T., Koski, I. R., Dooly, N. J. & Blaese, R. M.**: B cell differentiation and immunoregulatory T cell functions in human cord blood lymphocytes. J. Clin. Invest., **66**, 383-388 (1980).

20) **Köhler, G. & Milstein, C.**: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature., **256**, 495-497 (1975).

21) **McMichael, A. J., Pilch, J. R., Galfre, G., Mason, D. Y., Fabre, J. W. & Milstein, C.**: A human thymocyte antigen defined by a hybrid myeloma monoclonal antibody. Eur. J. Immunol., **9**, 205-210 (1979).

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

23) **Reinherz, E. L. & Schlossman. S. F.**: The differentiation function of human T lymphocytes. Cell., **19**, 821-827 (1980).

24) **Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G. & Schlossman, S. F.**: Further characterization of the human inducer T cell subset defined by monoclonal antibody. J. Immunol., **123**, 2894-2896 (1979).

25) **Reinherz, E. L., Kung, P. C., Breard, J. M., Goldstein, G. & Schlossman, S. F.**: T cell requirements for generation of helper factor (s) in man: Analysis of the subsets involved. J. Immunol., **124**, 1883-1887 (1980).

26) **Reinherz, E. L., Morimoto, C., Penta, A. C. & Schlossman, S. F.**: Regulation of B cell immunoglobulin secretion by functional subsets of T lymphocytes in man. Eur. J. Immunol., **10**, 570-572 (1980).

27) **Thomas, Y., Sosman, J., Irigoyen, O., Frei, S. M., Kung, P. C., Goldstein, G. & Chess, L.**: Functional analysis of human T cell subsets by monoclonal antibodies. I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B cell differentiation. J. Immunol., **125**, 2402-2408 (1980).

28) **Thomas, Y., Sosman, J., Rogozinski, L., Irigoyen, O., Kung, P. C., Goldstein, G. & Chess, L.**: Functional analysis of human T cell subsets by monoclonal antibodies. II. Regulation of helper factor production by T cell subsets. J. Immunol., **126**, 1948-1951 (1981).

29) **Forsgren, A., Suedjelund, A. & Wigzell, H.**: Lymphocyte stimulation by protein A of staphylococcus aureus. Eur. J. Immunol., **6**, 207-213 (1976).

30) **Kearney, J. F. & Lawton. A. R.**: B lymphocyte differentiation induced by lypopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes. J. Immunol., **115**, 671-676 (1975).

31) **沢井政信・須藤忠満・奥村一・森田司郎・佐藤茂・松本紳一郎・右田俊介**：ラテックス凝集反応の近赤外比濁法によるイムノアッセイ．臨床化学シンポジウム．Vol 18. (1978).

32) **沢井政信**：ラテックス近赤外比濁法：原理とFOP，hCGの測定，免疫実験操作法Ⅷ. 2393-2400 (1979).

33) **Saxon, A. & Stevens, R. H.**: Suppression of immunoglobulin production in normal human blood: Characterization of the cells responsible and mediation by a soluble T lymphocyte-derived factor. Clin. Immunol. Immunopathol., **10**, 427-437 (1978).

Regulation of Immunoglobulin Production by Human T Cell Subsets Defined with Monoclonal OKT4 and OKT8 Antibodies: A Comparative Study in Nocardia Water Soluble Mitogen (NWSM)- and Pokeweed Mitogen (PWM)-Stimulated Culture System

Naoto Uwadana, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 – J. Juzen Med. Soc., **92**, 136–146 (1983)

Key words: Nocardia Water Soluble Mitogen (NWSM), Pokeweed Mitogen (PWM), Monoclonal Antibodies, T Cell Subsets, Cellular Interaction

Abstract

Two distinct human T cell subsets, $OKT4^+$ and $OKT8^+$ cell-rich population were negatively separated by complement-mediated cytolysis with the use of monoclonal OKT4 (helper/inducer) and OKT8 (suppresor/cytotoxic) antibodies. Regulatory function of these T cell subsets on the differentiation of B cells into immunoglobulin-producing cells (Ig-PC) was assessed in *Nocardia* water soluble mitogen (NWSM)- and pokeweed mitogen (PWM)-stimulated cultures. The synthesis and secretion of immunoglobulin (Ig) by B cells in cultures stimulated with NWSM or PWM were evaluated by enumeration of intracytoplasmic Ig-PC using a direct immunofluorescence method and by quantitation of Ig released into culture supernatant in a latex photometric immunoassay.

Helper activity of each T cell subset was measured as the ability of added T cells to restore the generation of Ig-PC or the production of Ig by B cells. In the NWSM system, both $OKT4^+$ and $OKT8^+$ subsets, when added back to autologous B cells, markedly enhanced the generation of Ig-PC or the production of Ig. In the PWM system, only the $OKT4^+$ subset provided efficient helper activity for B cell differentiation; the $OKT8^+$ subset could not. Suppressor activity was evaluated as the capacity of added T cells to depress Ig-PC generation or Ig production by B cells in the presence of adequate helper cell function. In the PWM system, the $OKT8^+$ subset, but $OKT4^+$ subset, when added to a mixture of autologous B and $OKT4^+$ cells, suppressed the generation of Ig-PC or the production of Ig. In the NWSM system, however, neither $OKT8^+$ nor $OKT4^+$ subsets showed any appreciable suppression on B cell differentiation.

Cellular interaction between $OKT4^+$ and $OKT8^+$ cells in suppression B cell differentiation was analyzed in the NWSM-driven system with the use of PWM-prestimulated T cell subsets. The generation of Ig-PC or the production of Ig by B cells with the help of untreated $OKT4^+$ cells was not affected by further addition of $OKT8^+$ cells. However, the generation of Ig-PC or the production of Ig with the help of PWM-prestimulated $OKT4^+$ cells was depressed to a similar extent by the addition of $OKT8^+$ cells.

These results indicated that NWSM by itself did not activate suppressor T cells, but that $OKT8^+$ cells, when used in combination with PWM-prestimulated $OKT4^+$ cells, were able to exert suppressor effect on B cell differentiation and also that PWM-prestimulated $OKT4^+$ cells had a pivotal role in the expression of suppressor activity by $OKT8^+$ cells in this system.