

# 臍帯血T細胞サブセットの機能的特異性-1-モノクローナル抗体(OKT4およびOKT8)で識別される臍帯血T細胞サブセットのB細胞分化調節能

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9011">http://hdl.handle.net/2297/9011</a>

## 臍帯血 T 細胞サブセットの機能的特異性

### 〔I〕 モノクローナル抗体 (OKT4 および OKT8) で識別される 臍帯血 T 細胞サブセットの B 細胞分化調節能

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 谷口 昂教授)

谷内江 昭 宏

(昭和57年9月27日受付)

モノクローナル抗体 OKT 4 および OKT 8 により識別される T 細胞サブセットの PWM 刺激下での B 細胞分化調節能を検討した。種々の年齢の小児の末梢血中のこれら T 細胞サブセットの比率を、間接蛍光抗体法を用いて検定した。成人末梢血に比して、臍帯血では、OKT 4<sup>+</sup>細胞の比率が高く (55.7±4.7% に対して 74.4±6.6%)、逆に OKT 8<sup>+</sup>細胞の比率は著明に低下していた (31.2±5.9% に対して 14.6±5.0%)。OKT 8<sup>+</sup>細胞の比率は年齢と共に増加し、OKT 8<sup>+</sup>細胞と OKT 4<sup>+</sup>細胞の比は 3~5 歳頃には成人と同様となった。モノクローナル抗体 OKT 4 および OKT 8 で識別される 2 つの異なる T 細胞サブセットを、これらの抗体と補体 (ウサギ血清) を用いた細胞融解により相反するサブセットを除去し、臍帯血及び成人末梢血 T 細胞より単離した。これらの 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に及ぼす調節能を PWM 刺激下で検討した。従来からの報告通り、成人 OKT 4<sup>+</sup>細胞は成人末梢血 B 細胞に添加培養すると著明なヘルパー作用を発揮したが、成人 OKT 8<sup>+</sup>細胞にはこのような効果は認められなかった。一方臍帯血では、OKT 4<sup>+</sup>細胞、OKT 8<sup>+</sup>細胞のいずれのサブセットにも B 細胞分化に対するヘルパー作用は認められなかった。さらに、成人末梢血 B 細胞に自己 OKT 4<sup>+</sup>細胞を加えた系に、成人、あるいは臍帯血中のこれらのサブセットを添加培養し、それぞれのサブセットのサプレッサー活性を比較検討した。成人 OKT 8<sup>+</sup>細胞は B 細胞の Ig - PC への分化を強く抑制し、相反する OKT 4<sup>+</sup>細胞にはこのような抑制効果は認められなかった。これに対して、臍帯血 OKT 8<sup>+</sup>細胞による抑制効果は、成人 OKT 8<sup>+</sup>細胞による抑制よりも弱かった。しかし興味深いことには、臍帯血 OKT 4<sup>+</sup>細胞をこの培養系に添加すると、著明な B 細胞分化抑制が観察された。

これらの結果より、臍帯血 T 細胞は成人と同様、モノクローナル抗体 OKT 4、及び OKT 8 により識別されるサブセットより成るが、それぞれのサブセットの機能は成人末梢血 T 細胞のサブセットとは異なると考えられた。さらに、臍帯血 T 細胞による B 細胞分化抑制能は、臍帯血特有の T 細胞サブセットにより発揮されていることが示唆されたが、このようなサブセットの存在を明らかにする為に、新たなモノクローナル抗体を用いた解析が望まれる。

---

**Key words** 臍帯血リンパ球, T 細胞サブセット, モノクローナル抗体,  
B 細胞分化

---

マウスにおいては、T リンパ球はその表面 Ly 抗原の種類により、異なる機能を有するサブセットに分けられることが知られている<sup>1)</sup>。成熟マウスでは、Ly 1<sup>+</sup>23<sup>-</sup> T 細胞はヘルパー T 細胞として、また Ly 1<sup>-</sup>23<sup>+</sup> T 細胞

はサプレッサー T 細胞として働く<sup>2)</sup>とされている。ヒトにおいても、T 細胞を同種血清、異種血清、自己免疫病血清を用いたり、Fc-receptor の有無などにより機能を異にする T 細胞サブセットに分けられることが明

---

Functional Characteristics of Cord Blood T Cell Subsets. [I] Regulation of B Cell Differentiation by T Cell Subsets Defined with Monoclonal OKT4 and OKT8 Antibodies in Human Cord Blood. **Akihiro Yachie**, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University.

らかとなってきた<sup>9)-7)</sup>。

最近, Köller と Milstein らによる細胞融合法の開発により, ヒトリンパ球の表面抗原を識別するモノクローナル抗体が比較的容易につくり出されるようになった<sup>8)9)</sup>。特に, Reinherz らによる OKT シリーズモノクローナル抗体は, ヒト T 細胞の異なるサブセットの識別を可能とし, T 細胞機能の解析がより詳細に行われるようになった<sup>10)</sup>。これら OKT シリーズモノクローナル抗体の内, OKT 3 は末梢血 T 細胞の殆んど全てを識別し, OKT 4 は helper/inducer T 細胞を, OKT 8 は suppressor/cytotoxic T 細胞を識別するとされている。成人末梢血 T 細胞中では OKT 4 陽性細胞は 50~60%, OKT 8 陽性細胞は 20~30% を占め, これらは互いに相反する T 細胞サブセットを構成していることが明らかとなっている<sup>10)-14)</sup>。

一方, ヒト臍帯血 T 細胞が成人末梢血 T 細胞とは機能的に異なった点のあることが知られている。特に臍帯血 T 細胞は B 細胞の分化を抑制し, またこのような抑制活性は成人末梢血 T 細胞とは異なり, IgG Fc-receptor を欠く T 細胞サブセットにおいて著明であることが明らかとされている<sup>15)-19)</sup>。今回, モノクローナル抗体 OKT 4 および OKT 8 で識別される T 細胞サブセットの分布を, 臍帯血, 成人末梢血及び各年令の小児の末梢血について明らかにした。さらにそれぞれの T 細胞サブセット, すなわち OKT 4 陽性細胞及び OKT 8 陽性細胞を単離し, それぞれのサブセットが B 細胞分化に及ぼす影響を PWM 刺激下で検討した。

## 対象および方法

### I 対 象

臍帯血は児の娩出直後に臍帯を結紮, 切断の後, 胎盤側臍帯断端よりヘパリン加採血した。対象とした児の妊娠及び分娩経過はいずれも異常を認めなかった。臍帯血の採取に関しては, あらかじめ両親の承諾を得た。成人末梢静脈血は, 健康な 25~35 歳のボランティアよりヘパリン加採血した。生後 3 ヶ月から 5 才までの小児の静脈血は, 当科外来を受診した患児より両親の承諾を得て採取した。いずれも重篤な感染症の既往なく, 副腎皮質ホルモン剤, 免疫抑制剤等の服用も行っていない。

### II 末梢単核球分離

ヘパリン加静脈血をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline: 以下 PBS) にて約 2 倍に希釈し, これを Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nygaard & Co., Oslo, Norway) の上に静かに重層し, 400 G 20 分間, 4°C にて遠心した。遠心の後中間層より単核球を採取し, これを PBS にて 3 回, 200 G 10

分間, 4°C にて遠心して洗浄した。洗浄後, 細胞を RPMI 1640 培地 (GIBCO) に再浮遊し, 末梢単核球浮遊液とした。なお臍帯血については, 全血 1 容に対して 2.5% デキストラン加 PBS 1 容を加え混和し, 37°C 30 分間静置し白血球に富む上清を得た。この上清を同様に Ficoll-Hypaque に重層の後遠心し, 単核球を得た。

### III T 細胞及び B 細胞の分離

末分面末梢単核球浮遊液 ( $1 \times 10^7$ /ml に調節) をノイラミニダーゼ処理羊赤血球 (以下 NSRBC) 及びウシ胎児血清 (fetal bovine serum: 以下 FBS, GIBCO) と等量ずつ混合, 200 G 5 分間遠心の後室温にて 30 分間静置し, 羊赤血球ロゼット (以下 E ロゼット) 形成を行った。ノイラミニダーゼ処理羊赤血球は, あらかじめ PBS にて洗浄し,  $1 \times 10^9$ /ml に調節した羊赤血球 (以下 SRBC) 浮遊液 5 容に対して, PBS にて 30 倍に希釈したノイラミニダーゼ (Behringwerke) 1 容を加え, 37°C 30 分間反応させた。反応終了後, PBS にて 3 回洗浄し, 最終的に PBS にて  $2 \times 10^8$ /ml の NSRBC 浮遊液として用いた。FBS はあらかじめ 56°C 30 分間の熱処理にて非働化の後, さらに 37°C, 及び 4°C にて SRBC で吸収した後に用いた。E ロゼットは 30 分間の静置後, pellet を静かに再浮遊し Ficoll-Hypaque に重層し遠心した。中間層, すなわち E ロゼット非形成細胞層は PBS にて 3 回洗浄後, 再び E ロゼット形成, 比重遠心法をくり返し, 最後に得られた中間層を採取, 洗浄の後 RPMI 1640 培地に再浮遊, B 細胞分画とした。また pellet, すなわち E ロゼット形成細胞層は 10% FBS 加 RPMI 1640 培地を加え静かに再浮遊し, Ficoll-Hypaque に重層し比重遠心法をくり返した。最後に得られた pellet に 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  トリス緩衝液を加え, SRBC を溶血させた後 PBS にて洗浄した。洗浄後, 細胞を RPMI 1640 培地に再浮遊し, T 細胞分画とした。このようにして得られた B 細胞分画の内, 表面免疫グロブリン陽性細胞は 48~60% であり, また 30~48% の  $\alpha$ -ナフチルエステルアゼ陽性の単球の混入が認められた。B 細胞分画への E ロゼット形成細胞の混入は 0.5% 未満であった。また T 細胞分画の 92~96% は E ロゼット形成細胞であった。以下の実験では B 細胞分画を B 細胞, T 細胞分画を T 細胞として用いた。

### IV モノクローナル抗体を用いた T 細胞サブセットの分布の解析

Ortho 社製モノクローナル抗体 OKT 3, OKT 4 及び OKT 8 を用いて, 成人末梢血, 臍帯血また種々の年令の小児の末梢血の T 細胞サブセットの分布を検索した。 $5 \times 10^6$ /ml ~  $1 \times 10^7$ /ml の濃度に調節した T 細胞浮遊液 0.1 ml に, モノクローナル抗体 2.5  $\mu$ l を加え氷水中にて 30 分間反応させた後, PBS にて 2 回洗浄した。再

浮遊した T 細胞に、40 倍希釈した蛍光標識抗マウス IgG ヤギ血清(以下 G/M FITC, Cappel Laboratories) を等量ずつ加え、再び氷水中にて 30 分間反応させ、PBS にて 2 回洗浄した。最後に pellet を再浮遊させ等量の 30% グリセリンを加え、1 滴をスライドグラスに載せ陽性細胞の百分比を Olympus 蛍光顕微鏡下で算定した。算定は少なくとも 250 個以上の細胞を観察して行った。また一部の検体は蛍光染色の後、PBS にて  $1 \times 10^6$ /ml の細胞浮遊液に調整し、fluorescence-activated cell sorter (FACS IV, Becton Dickinson) を用いて蛍光陽性細胞の輝度分布を解析した。

#### V モノクローナル抗体により識別される T 細胞サブセットの単離

モノクローナル抗体及び補体を用いた細胞融解により、T 細胞中の互いに相反するサブセットを除去、OKT 4 あるいは OKT 8 陽性細胞が豊富な分画を得た。RPMI 1640 培地に浮遊した T 細胞に OKT 4 あるいは OKT 8 を 1/2000 量加え、室温にて 30 分間反応させ、さらに新鮮、あるいは  $-80^\circ\text{C}$  にて凍結保存してあるウサギ血清を 1/10 量加え、 $37^\circ\text{C}$  にて 45 分間反応させた。その後 RPMI 1640 培地にて 2 回洗浄、死細胞などによる凝集塊を除去後再浮遊した。トリパン青を用いた検定では、このようにして得られた細胞の 92% 以上は生細胞であった。またそれぞれの分画を間接蛍光抗体法により検定すると、OKT 4 で処理した細胞の 78~88% は OKT 8 陽性細胞(以下 OKT 8<sup>+</sup>細胞)であり、OKT 4 陽性細胞(以下 OKT 4<sup>+</sup>細胞)は 3% 以下であった。また OKT 8 にて処理した細胞の内、OKT 4<sup>+</sup>細胞は 82~92% であり、OKT 8<sup>+</sup>細胞は 3% 以下であった。これらの細胞分画の内、OKT 4 にて処理したものを OKT 8<sup>+</sup>細胞、また OKT 8 にて処理したものを OKT 4<sup>+</sup>細胞として以下の実験に供した。

#### VI 培養条件

培養液は RPMI 1640 培地に 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  $\mu\text{g}$ /ml) 及び 20% 非働化済 FBS を加えたものを用いた。 $5 \times 10^5$  の B 細胞に種々の量の T 細胞サブセットを加え培養液にて最終的に 1 ml とし、13 $\times$ 100 mm のプラスチック培養試験管(2027, Facon)に浮遊した。培養は pokeweed mitogen(PWM, GIBCO)5  $\mu\text{l}$ /ml を加え、炭酸ガス培養恒温器内で  $37^\circ\text{C}$ 、炭酸ガス濃度 5% 存在下で 7 日間施行した。

#### VII 免疫グロブリン産生細胞の検出

PWM 刺激下で B 細胞より誘導される免疫グロブリン産生細胞 (immunoglobulin-producing cell 以下 Ig-PC) の検出は、Kearney らの方法<sup>20)</sup>に従い施行した。すなわち、7 日間の培養後回収された生細胞数を血

球計算盤にて算定、PBS にて 2 回洗浄した。洗浄後細胞を PBS に浮遊し、 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ /ml に調整、適量をスライドグラスに載せ冷風乾燥し、5% 氷酢酸加エタノールで  $-20^\circ\text{C}$ 、30 分間固定した。固定終了後充分量の PBS で洗浄し、FITC 標識家兎抗ヒト Ig 血清 (polyvalent; IgG+IgM+IgA, Behringwerke) を PBS にて 20 倍に希釈してスライドグラスに載せ 30 分間染色した。PBS にて充分洗浄の後、蛍光顕微鏡下で少なくとも 500 ケ以上の細胞を観察し、細胞質内の免疫グロブリン陽性細胞の百分比を算定した。Ig-PC 数は、細胞質内 Ig 陽性細胞百分比及び回収された生細胞数より、その絶対数を算出した。

#### VIII T 細胞サブセットの B 細胞分化に及ぼすヘルパー作用の検討

臍帯血及び成人末梢血 T 細胞サブセットの、自己 B 細胞分化に及ぼすヘルパー作用を検討する為、 $5 \times 10^5$  の B 細胞に種々の量の自己 T 細胞サブセットを加え培養した。Ig-PC は、FITC 標識家兎抗ヒト Ig 血清 (polyvalent) を用いて検定した。また臍帯血 OKT 4<sup>+</sup>細胞のヘルパー活性を検討する為、成人末梢血 B 細胞に等量の臍帯血 OKT 4<sup>+</sup>細胞を加え培養した。Ig-PC は FITC 標識家兎抗ヒト Ig 血清 (IgG, IgM or IgA) を用いて検定した。

#### IX T 細胞サブセットの B 細胞分化抑制効果の検討

成人末梢血 B 細胞  $3.5 \times 10^5$  に自己 OKT 4<sup>+</sup>細胞  $1.5 \times 10^5$  を加えた系に、種々の量の臍帯血あるいは非自己成人末梢血 T 細胞サブセットを加えて培養した。Ig-PC は FITC 標識家兎抗ヒト Ig 血清 (polyvalent) を用いて検定した。B 細胞分化抑制効果は下記の要領で抑制率を算出して示した。

抑制率 (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{T細胞サブセット添加培養で出現する Ig-PC 数}}{\text{B細胞+OKT 4<sup>+</sup>細胞のみの培養で出現する Ig-PC 数}}\right) \times 100$$

#### 成 績

I 臍帯血及び成人末梢血 T 細胞サブセットの比率  
臍帯血及び成人末梢血 T 細胞を、モノクローナル抗体 OKT 3, OKT 4 および OKT 8 を用いてその陽性細胞の比率を検討した。FACS を用いた蛍光輝度分布グラフに示す如く、E ロゼット法により得られた T 細胞は、臍帯血、成人末梢血共にその 90% 以上が OKT 3<sup>+</sup>細胞であった。また OKT 4<sup>+</sup>細胞の比率は、臍帯血 T 細胞 (74.7 $\pm$ 6.6%) では成人末梢血 T 細胞 (55.7 $\pm$ 4.7%) より有意に高く、これに対して OKT 8<sup>+</sup>細胞の比率は、臍帯血 T 細胞 (14.6 $\pm$ 5.0%) では成人末梢血 T 細胞 (31.2 $\pm$ 5.9%) に比して著しく低値を示した(図

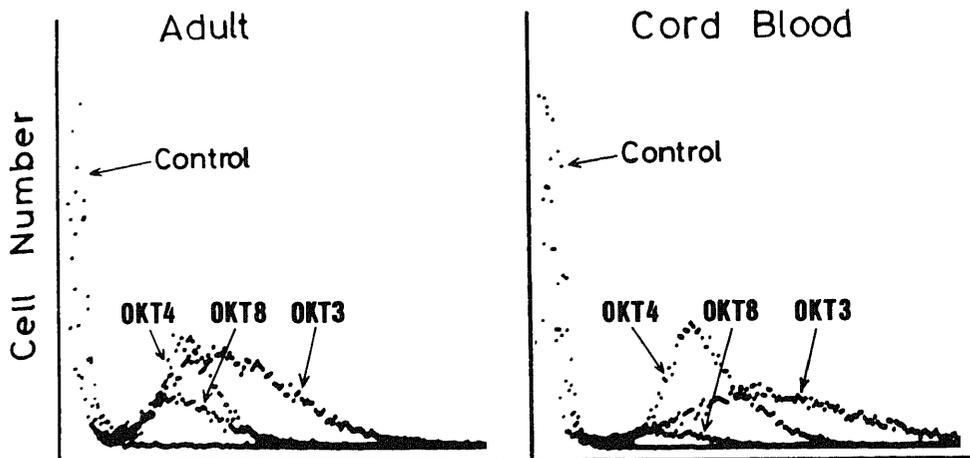


Fig 1. Immunofluorescence profiles of adult and cord blood T cells with OKT antisera. Reactivity of adult peripheral or cord blood T cells with OKT3, OKT4 and OKT8 was studied. T cell population were stained with OKT antisera and G/M FITC.

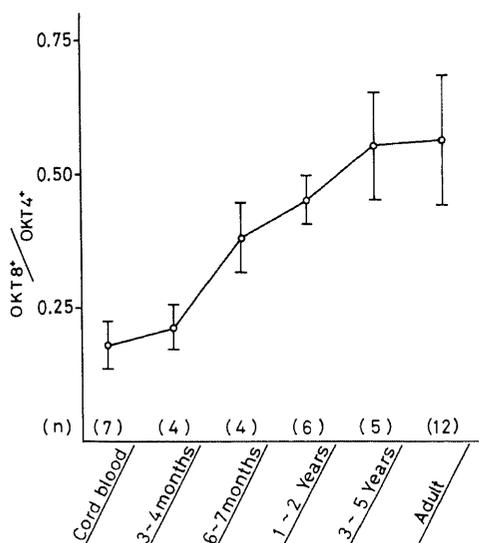


Fig. 2. Ratio of OKT 8<sup>+</sup> cells to OKT 4<sup>+</sup> cells in various age groups. The numbers of OKT 4<sup>+</sup> and OKT 8<sup>+</sup> cells were counted and the ratio of OKT 8<sup>+</sup> cells to OKT 4<sup>+</sup> cells were calculated. Data represent the mean (±SD) of the ratios.

1).

II T細胞サブセット比の年齢による推移

OKT 8<sup>+</sup>細胞と OKT 4<sup>+</sup>細胞の比は、臍帯血 T 細胞では 0.18±0.04 と成人末梢血 T 細胞 (0.56±0.12) に比し有意に低下していた。OKT 8<sup>+</sup>細胞の比率は年齢と共に徐々に増加し、3～5 歳では OKT 8<sup>+</sup>細胞と OKT 4<sup>+</sup>細胞の比はほぼ成人と同様のレベルにまで達していた (図 2)。

III T細胞サブセットの B細胞分化に及ぼすヘルパー作用

自己 T細胞サブセット、すなわち OKT 4<sup>+</sup>細胞あるいは OKT 8<sup>+</sup>細胞が、PWM 刺激系における B細胞の Ig-PC への分化に及ぼす影響について検討した。成人末梢血 B細胞に自己 OKT 4<sup>+</sup>細胞を加えた系では、Ig-PC 数の著明な増加が認められ、その数は B細胞 5×10<sup>6</sup>に対して OKT 4<sup>+</sup>細胞を 2.5×10<sup>6</sup>加えた場合に最大となった。これに対して B細胞に自己 OKT 8<sup>+</sup>細胞を加えた場合には、このような Ig-PC の出現は殆んど認められなかった (図 3 A)。一方、臍帯血 B細胞に自己 OKT 4<sup>+</sup>細胞、あるいは OKT 8<sup>+</sup>細胞を加えても Ig-PC への分化は殆んど認められなかった (図 3 B)。

次に OKT 4<sup>+</sup>細胞のヘルパー作用をより明らかにする為、臍帯血あるいは成人末梢血 OKT 4<sup>+</sup>細胞を、自己と異なる B細胞に加え、各クラスの免疫グロブリン産生細胞の出現を検討した。臍帯血 OKT 4<sup>+</sup>細胞を加えた場合には、臍帯血 B細胞、成人末梢血 B細胞のいずれも Ig-PC への分化は殆んど認められなかった。成人末梢血 OKT 4<sup>+</sup>細胞を成人末梢血 B細胞に加え培養すると、各クラスの免疫グロブリン産生細胞が出現したが、臍帯血 B細胞に加えた場合には IgM 産生細胞のみの出現が認められた (表 1)。

IV 臍帯血 T細胞サブセットによる B細胞分化抑制

臍帯血 OKT 4<sup>+</sup>細胞、および OKT 8<sup>+</sup>細胞が成人末梢血 B細胞の Ig-PC への分化に及ぼす抑制効果を検討した。成人末梢血 B細胞に自己 OKT 4<sup>+</sup>細胞を加えた系に、自己と異なる成人末梢血未分画 T細胞を加えても、Ig-PC 産生の抑制は殆んど認められなかった。し

かし、この系に臍帯血未分画 T 細胞を添加し培養すると、Ig-PC 産生は加えた T 細胞の量に応じて著明に抑制された。さらにこれらの抑制効果を T 細胞の各々のサブセットについて検討した。成人末梢血では OKT 4<sup>+</sup> 細胞は殆んど Ig-PC 産生を抑制せず、むしろやや増強させたが、OKT 8<sup>+</sup> 細胞はその加えた量に従い B 細胞分

化を著明に抑制した(図 4 A)。一方臍帯血では、OKT 8<sup>+</sup> 細胞を加えた系ではその量に応じて抑制効果が認められたが、その抑制率は未分画 T 細胞に比し低かった。しかし、臍帯血 OKT 4<sup>+</sup> 細胞を加えると、B 細胞分化は著明に抑制され、その抑制率は成人末梢血 OKT 8<sup>+</sup> 細胞に匹敵するものであった(図 4 B)。

## Fluorescence Intensity

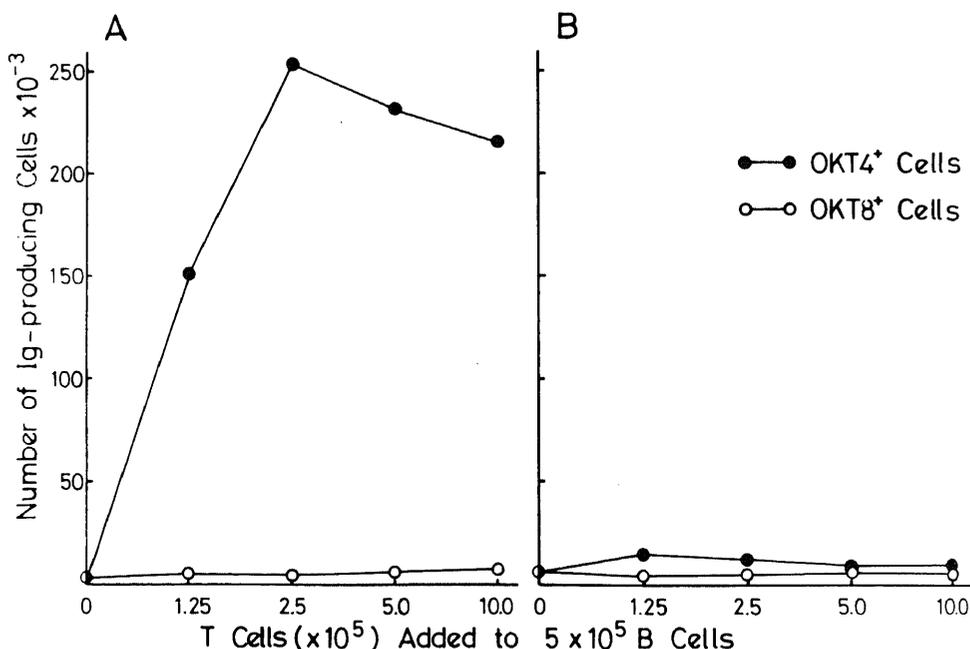


Fig 3. Effect of T cell subsets on autologous B cell differentiation. Graded numbers of OKT4<sup>+</sup> cells (●—●) and OKT8<sup>+</sup> cells (○—○) from adult (A) and cord blood (B) were added to cultures containing autologous B cells ( $5 \times 10^5$ ), and the cultures were performed for 7 days in the presence of PWM. The numbers of Ig-producing cells were enumerated after the culture.

Table 1. Helper activity of OKT4<sup>+</sup> cells for B cell differentiation in PWM-driven system.\*

B Cells Cultured	OKT4 <sup>+</sup> Cells	No. of Ig-producing Cells $\times 10^{-3}$		
		IgM	IgG	IgA
Adult	Adult	73.3 $\pm$ 25.8	62.5 $\pm$ 5.0	79.5 $\pm$ 12.5
	Cord Blood	3.9 $\pm$ 1.6	2.6 $\pm$ 1.3	4.0 $\pm$ 1.6
Cord Blood	Adult	58.7 $\pm$ 8.1	0.8 $\pm$ 0.4	5.7 $\pm$ 3.8
	Cord Blood	3.3 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.8

\* B cells ( $5 \times 10^5$ ) were co-cultured for 7 days with equal numbers of OKT4<sup>+</sup> cells from cord blood or unrelated adult in the presence of pokeweed mitogen (PWM). Data represent the mean ( $\pm$ SD) of 3 separate experiments.

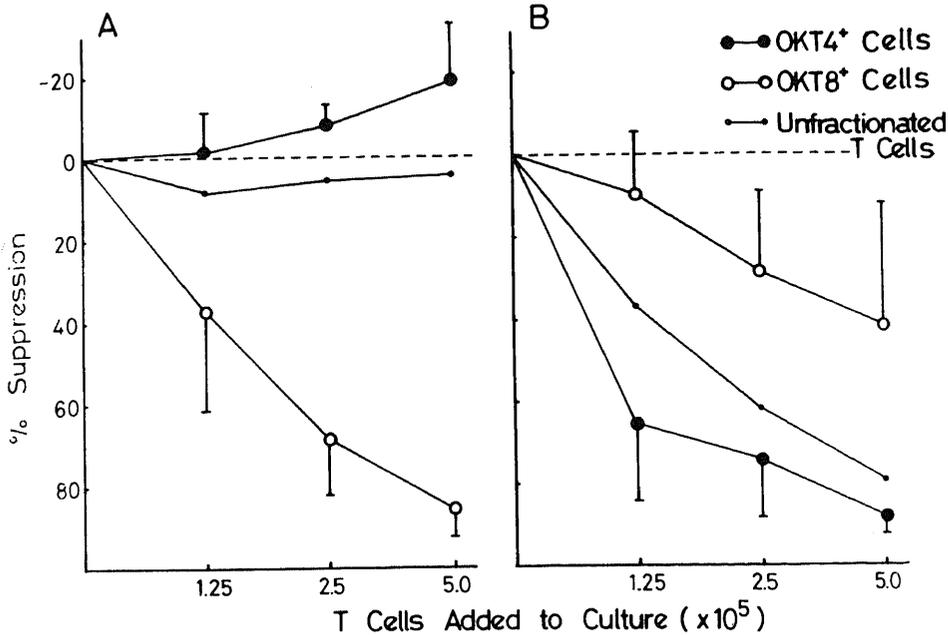


Fig 4. Effect of T cell subsets on B cell differentiation in adult B cells plus OKT4<sup>+</sup> cells. Graded numbers of OKT4<sup>+</sup> cells (●—●) or OKT8<sup>+</sup> cells (○—○) from adult (A) and cord blood (B) were added to the cultures containing adult B cells plus OKT4<sup>+</sup> cells and cultured in the presence of PWM for 7 days. The standard culture contained 3.5×10<sup>5</sup> adult B cells and 1.5×10<sup>5</sup> adult OKT4<sup>+</sup> cells. After the culture, the numbers of Ig-producing cells per culture were counted. Results were expressed as percent suppression compared with control culture without addition of T cell subsets. Each datum point represents the mean of 5 separate experiments. Vertical bars represent ±SD.

考 察

モノクローナル抗体 OKT 4 及び OKT 8 により識別される T 細胞サブセットの分布を、成人末梢血と臍帯血とで比較すると、臍帯血では成人末梢血に比し、OKT 8<sup>+</sup>細胞の比率は著しく低下しており、逆に OKT 4<sup>+</sup>細胞の比率は成人末梢血に比し有意に増加していた。このような T 細胞サブセット分布の特徴は年齢と共に変化し、3~5 歳頃には成人と同様の分布を示すようになった。

Oldstone<sup>21)</sup>, Hayward<sup>15)</sup>らは臍帯血 T 細胞が、PWM で誘導される成人末梢血 B 細胞の Ig-PC への分化を抑制すると報告しており、また当教室の宮脇<sup>22)</sup>は、このような臍帯血 T 細胞による抑制効果は 2 歳頃には消失するとしている。臍帯血 T 細胞の B 細胞分化抑制効果に関して、Oldstone ら<sup>21)</sup>は臍帯血中に T $\gamma$ 細胞の比率が高いことがその理由ではないかと報告したが、当教室森谷<sup>23)</sup>は臍帯血 T 細胞による B 細胞分化抑制能の殆んどが、Tnon- $\gamma$ 細胞により発揮されていることを示した。マウスによる知見から、このような臍帯血 T 細胞の機能的特異性、特にその抑制能が成人末梢

血 T 細胞の場合とは異なるサブセットにより発揮されていることが予想された<sup>24)</sup>。さらに臍帯血 T 細胞において、その著しい B 細胞分化抑制能にもかかわらず、成人末梢血中の suppressor/cytotoxic T 細胞とされる OKT 8<sup>+</sup>細胞の比率が低いことは、臍帯血 T 細胞の抑制活性の主たる部分が OKT 8<sup>+</sup>細胞とは異なるサブセットに存在する可能性を示唆した。このような臍帯血 T 細胞の抑制能がどのようなサブセットにより発揮されているかを明らかにする為、OKT シリーズモノクローナル抗体と補体を用いてそれぞれのサブセットを単離、これらのサブセットの B 細胞分化に及ぼす影響を検討した。従来の報告<sup>11)</sup>通り、成人末梢血 OKT 4<sup>+</sup>細胞は PWM 刺激下で B 細胞の Ig-PC への分化を促進し、OKT 8<sup>+</sup>細胞にはこのような効果は認められなかった。一方、臍帯血 T 細胞サブセットでは、OKT 4<sup>+</sup>細胞、OKT 8<sup>+</sup>細胞のいずれにもヘルパー作用は認められなかった。また臍帯血 OKT 4<sup>+</sup>細胞のヘルパー作用をさらに詳しく評価する為、成人末梢血 B 細胞と共にこれを培養し、各クラスの免疫グロブリン産生細胞の出現を検討した。しかし臍帯血 OKT 4<sup>+</sup>細胞の添加によっては、

いずれのクラスの免疫グロブリン産生細胞の出現も殆んど認められなかった。これに対して、成人末梢血 OKT 4<sup>+</sup>細胞を成人末梢血 B 細胞に加えて培養すると、各クラスの Ig-PC の出現を認めた。一方、臍帯血 B 細胞に成人末梢血 OKT 4<sup>+</sup>細胞を加えた場合には、IgM 産生細胞に限ってその出現を認めた。このように成人とは異なり、臍帯血 T 細胞及びそのサブセットは、PWM 刺激下での B 細胞分化に対して殆んどヘルパー作用を示さないことが明らかとなった。すなわち、臍帯血 T 細胞サブセット、ことに OKT 4<sup>+</sup>細胞が、成人末梢血のヘルパー T 細胞と同様の表面形質を有しているにもかかわらず、殆んどヘルパー作用を認めないことから、このサブセットが機能的に未熟であるか、あるいは成人末梢血の OKT 4<sup>+</sup>細胞とは機能的に異なる特有のサブセットを構成する可能性が示唆された。

さらに、B 細胞分化に及ぼす臍帯血 T 細胞サブセットの抑制効果について検討した。Reinherz らの報告<sup>13)14)</sup>通り、成人末梢血 OKT 8<sup>+</sup>細胞により、PWM 存在下での B 細胞の Ig-PC への分化は強く抑制された。また OKT 4<sup>+</sup>細胞にはこのような抑制効果は認められなかった。臍帯血 OKT 8<sup>+</sup>細胞を加えると確かに B 細胞分化は抑制されたが、その抑制の程度は成人末梢血 OKT 8<sup>+</sup>細胞に比し弱く、これに対して臍帯血 OKT 4<sup>+</sup>細胞は B 細胞分化を著明に抑制した。

以上、臍帯血では OKT 4<sup>+</sup>細胞の比率が高く、PWM 刺激下での B 細胞分化に対してこのサブセットが著明な抑制効果を示すことから、臍帯血 T 細胞による B 細胞分化抑制効果の殆んどは OKT 4<sup>+</sup>細胞により発揮されていると考えられた。このように、臍帯血 T 細胞は成人末梢血 T 細胞と同様の表面形質を有するサブセットより成るが、その分布及び各サブセットの有する機能は著しく異なることが明らかとなった。

成熟マウスでは、ヘルパー T 細胞は Ly 1<sup>+</sup>23<sup>-</sup>、また サプレッサー T 細胞は Ly 1<sup>-</sup>23<sup>+</sup>の表面形質を有するとされ<sup>12)</sup>、OKT シリーズモノクローナル抗体で識別されるヒト T 細胞サブセット、すなわち OKT 4<sup>+</sup>細胞及び OKT 8<sup>+</sup>細胞もこれらと相似の関係を有していると考えられる。しかし、新生児マウスでは成熟マウスとは異なり、表面形質 Ly 1<sup>+</sup>23<sup>+</sup>を有するサブセットによりサプレッサー能が発揮されていることが知られている<sup>24)</sup>。さらにここでは、ヒト臍帯血 T 細胞による B 細胞分化の抑制は成人とは異なり、その殆んどが OKT 4<sup>+</sup>細胞により発揮されていることを示した。すなわち、新生児マウスにおける Ly 1<sup>+</sup>23<sup>+</sup>T 細胞と同様、ヒト臍帯血 T 細胞においても B 細胞の Ig-PC への分化抑制効果は、成人末梢血サプレッサー T 細胞とは異なる、臍帯血特有の T 細胞サブセットにより発揮されていることが示

唆された。また、OKT 4<sup>+</sup>細胞は、成人末梢血では B 細胞分化に対してヘルパー作用を示すが、臍帯血 OKT 4<sup>+</sup>細胞は B 細胞分化を著明に抑制した。これらの事実は、OKT 4 により識別される T 細胞サブセットが、さらに複数の、機能の異なるサブセットを含んでいる可能性を暗示している。最近 Reinherz ら<sup>25)</sup>は、抗原刺激後の表面 Ia 様抗原の発現の有無により、OKT 4<sup>+</sup>細胞は少なくとも 2 つの異なったサブpopulation に分けられると報告している。これらより、新生児マウスの Ly 1<sup>+</sup>23<sup>+</sup>T 細胞に対応する、新生児期特有の T 細胞サブセットがヒト臍帯血 OKT 4<sup>+</sup>細胞の一部を形成していることが予想される。したがって、特に新生児期における T 細胞機能の解析には、このようなサブセットを識別する新たなモノクローナル抗体の開発と、さらに詳細な検討が必要と考えられる。

## 結 論

OKT シリーズモノクローナル抗体を用いて、これらモノクローナル抗体によって識別される臍帯血 T 細胞サブセットの、B 細胞分化に及ぼす影響、特にその抑制能について検討した。

1. 臍帯血 T 細胞では、成人末梢血 T 細胞に比し OKT 4<sup>+</sup>細胞の比率が有意に高く、逆に OKT 8<sup>+</sup>細胞の比率は著明に低下していた。このような T 細胞分布の特徴は年令と共に変化し、3~5 歳頃にはほぼ成人と同様の分布を示した。このように臍帯血では T 細胞サブセットの分布は異なるものの、成人末梢血と同様の表面形質を有する T 細胞サブセットの存在が確認された。

2. 臍帯血 OKT 4<sup>+</sup>細胞を自己 B 細胞、あるいは成人末梢血 B 細胞に添加して PWM 刺激下で培養したが、Ig-PC の出現は殆んど認められなかった。すなわち、臍帯血中には成人末梢血と同様、モノクローナル抗体 OKT 4 により識別される T 細胞サブセットが存在するが、成人と異なり B 細胞分化に対するヘルパー作用は認められなかった。

3. 臍帯血 T 細胞サブセットの成人末梢血 B 細胞分化に及ぼす抑制効果は、その大部分が OKT 8<sup>+</sup>細胞ではなく、OKT 4<sup>+</sup>細胞により発揮されていると考えられた。

以上、臍帯血 T 細胞は OKT シリーズモノクローナル抗体を用いた検索では、成人末梢血と同様の表面形質を有する T 細胞サブセットより成るが、その分布及び B 細胞分化に及ぼす影響は、成人末梢血 T 細胞とは大きく異なると考えられた。さらに、臍帯血 T 細胞には新生児マウスの Ly 1<sup>+</sup>23<sup>+</sup>サプレッサー T 細胞と同様の、新生児期特有のサブセットが含まれる可能性が示

唆された。

References〔I〕

- 1) Cantor, H. & Boyse, E. A. : Lymphocytes as models for the study of mammalian cellular differentiation. *Immunol. Rev.*, **33**, 105 - 124 (1977).
- 2) Cantor, H. & Gershon, R. K. : Immunological circuits: Cellular composition. *Fed. Proc.*, **38**, 2058 - 2063 (1978).
- 3) Evans, R. L., Lazarus, H., Penta, A. C. and Schlossman, S. F. : Two functionally distinct subpopulations of human T cells that collaborate in the generation of cytotoxic cells responsible for cell-mediated lympholysis. *J. Immunol.*, **120**, 1423 - 1428 (1978).
- 4) Strelkauskas, A. J., Schauf, V., Wilson, B. S., Chess, L. & Schlossman S. F. : Isolation and characterization of naturally occurring subclasses of human peripheral blood T cells with regulatory functions. *J. Immunol.*, **120**, 1278 - 1282 (1978).
- 5) Morimoto, C., Reinherz, E. L., Borel, Y., Mantzouranis, E., Steinberg, A. D. & Schlossman, S. F. : Autoantibody to an immunoregulatory population in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, **67**, 753 - 761 (1981).
- 6) Morimoto, C., Abe, T., Toguchi, T., Kiyotaki, M. & Homma, M. : Studies of anti-lymphocyte antibody of patients with active SLE. *Scand. J. Immunol.*, **10**, 213 - 221 (1979).
- 7) Moretta, L., Ferrarini, M., Mingari, M. C., Moretta, A. & Webb, S. R. : Subpopulations of human T cells identified by receptors for immunoglobulins and mitogen responsiveness. *J. Immunol.*, **117**, 2171 - 2174 (1976).
- 8) Köhler, G. & Milstein, C. : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495 - 497 (1975).
- 9) Diamond, B. A., Yelton, D. E. & Scharff, M. D. : Monoclonal antibodies. A new technology for producing serologic reagents. *N. Engl. J. Med.*, **304**, 1344 - 1349 (1981).
- 10) Reinherz, E. L. & Schlossman, S. F. : The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell*, **19**, 821 - 827 (1980).
- 11) Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G. & Schlossman, S. F. : Further characterization of the human inducer T cell subsets defined by monoclonal antibody. *J. Immunol.*, **123**, 2894 - 2896 (1979).
- 12) 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).
- 13) 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).
- 14) Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G. & Schlossman, S. F. : A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic/suppressor T cell subset previously defined by a heteroantiserum termed TH<sub>2</sub>. *J. Immunol.*, **124**, 1301 - 1307 (1980).
- 15) Hayward, A. R. & Lawton, A. R. : Induction of plasma cell differentiation of human lymphocytes: Evidence for functional immaturity of T and B cells. *J. Immunol.*, **119**, 1213 - 1217 (1977).
- 16) 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).
- 17) Hayward, A. R. & Lydyard, P. M. : Suppression of B lymphocyte differentiation by newborn T lymphocytes with an Fc receptor for IgM. *Clin. Exp. Immunol.*, **34**, 374 - 378 (1978).
- 18) Moriya, N., Nagaoki, T., Okuda, N. & Taniguchi, N. : Suppression of adult B cell differentiation in pokeweed mitogen-stimulated cultures by Fc (IgG) receptor-negative T cells from cord blood. *J. Immunol.*, **123**, 1795 - 1798 (1979).
- 19) Miyawaki, T., Moriya, N., Nagaoki, T., Kubo, M., Yokoi, T. & 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).
- 20) Kearney, J. & Lawton, A. R. : B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes. *J. Immunol.*, **115**, 671 - 676 (1975).
- 21) Oldstone, M. B. A., Tishon, A. & Moretta, L. : Active thymus derived suppressor lymphocytes

- in human cord blood. *Nature*, **269**, 333 - 335 (1977).
- 22) 宮脇利男: 成長に伴う T リンパ球のもつ B 細胞分化抑制能の推移, 十全医会誌, **89**, 291 - 301 (1980)
- 23) 森谷直樹: 臍帯血 T 細胞の成人 B 細胞分化抑制能, I, 臍帯血 T 細胞 subsets (T $\gamma$ , Tnon- $\gamma$  細胞) の成人免疫グロブリン産生細胞数に及ぼす影響, 十全医会誌, **89**, 354 - 361(1980).
- 24) Mosier, D. E., Mathieson, B. J. & Campbell, P. S.: Ly phenotype and mechanism of action of

mouse neonatal suppressor T cells. *J. Exp. Med.*, **146**, 59 - 73 (1977).

- 25) Reinherz, E. L., Morimoto, C., Penta, A. C. & Schlossman, S. F.: Subpopulations of the T 4<sup>+</sup> inducer T cell subset in man: Evidence for an amplifier population preferentially expressing Ia antigen upon activation. *J. Immunol.*, **126**, 67 - 70 (1981).

**Functional Characteristics of Cord Blood T Cell Subsets [I] Regulation of B Cell Differentiation by T Cell Subsets Defined with Monoclonal OKT4 and OKT8 Antibodies in Human Cord Blood** Akihiro Yachie, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - *J. Juzen Med. Soc.*, **91**, 818 - 827 (1982)

**Key words:** Cord Blood Lymphocytes, T Cell Subsets, Monoclonal Antibodies, B Cell Differentiation

#### Abstract

Regulatory function of T cell subsets defined with monoclonal OKT4 and OKT8 antibodies on B cell differentiation was studied in the pokeweed mitogen (PWM)-driven system. The relative proportions of these subsets in the peripheral blood from various age groups were determined by the indirect immunofluorescence method. Compared to the relative proportion of OKT4<sup>+</sup> cells (55.7 $\pm$ 4.7%) and of OKT8<sup>+</sup> cells (31.2 $\pm$ 5.9%) in adult peripheral blood, the former was higher (74.7 $\pm$ 6.6%) while the latter was significantly lower (14.6 $\pm$ 5.0%) in cord blood. The proportion of OKT8<sup>+</sup> cells increased with advancing ages and the ratio of OKT8<sup>+</sup> cells to OKT4<sup>+</sup> cells came near the adult level around 3 to 5 years of life. Two distinct T cell subsets defined with OKT4 and OKT8 monoclonal antibodies from cord blood and adult peripheral blood were separated by depleting the reciprocal subsets through the complement-mediated cytolysis, for which OKT antisera and the rabbit serum as complement source were used. The regulatory functions of these subsets on B cell differentiation into immunoglobulin-secreting cells (Ig-PC) were evaluated in the PWM-driven system. As reported previously, OKT4<sup>+</sup> cells from adult peripheral blood exerted efficient help to B cell differentiation, whereas adult OKT8<sup>+</sup> cells showed no helper effect when either subset was added to adult B cells in culture. Neither OKT4<sup>+</sup> cells nor OKT8<sup>+</sup> cells from cord blood helped B cell differentiation in this culture system. Suppressor activity of these subsets was compared in the culture system where each subset of T cells from adult peripheral blood or cord blood was added to a mixture of adult B cells and OKT4<sup>+</sup> cells. As was expected, adult OKT8<sup>+</sup> cells suppressed significantly the differentiation of B cells into Ig-PC, but the reciprocal OKT4<sup>+</sup> cells had no such effect. On the contrary, the suppression by cord blood OKT8<sup>+</sup> cells was less significant than that mediated by adult OKT8<sup>+</sup> cells. Interestingly enough, a marked suppression of B cell differentiation was observed when OKT4<sup>+</sup> subset from cord blood was added to the culture system. These results suggest that T cell subsets from

cord blood, which are defined with monoclonal antibodies OKT4 and OKT8, may differ functionally from the phenotypically identical T cell subsets in adult peripheral blood, and that the suppression mediated by cord blood T cells might be exerted by a unique subset which must wait for further delineation using a new monoclonal antibody for its identification.