

# NWSM(Nocardia water-soluble mitogen)刺激系によるヒトB細胞分化能とT細胞調節能の成熟過程の解析

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/2297/8897">http://hdl.handle.net/2297/8897</a>

## NWSM (Nocardia water-soluble mitogen) 刺激系によるヒト B細胞分化能と T細胞調節能の成熟過程の解析

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 谷口 昂教授)

長 沖 武

(昭和56年1月30日受付)

**Key words** Nocardia water-soluble mitogen (NWSM)  
免疫グロブリン, B細胞分化能, T細胞調節能

新生児期の免疫能は成人と種々の点で異なることが、以前より指摘されてきた。Gathings ら<sup>1)</sup>は、新生児期の末梢血 B細胞が成人と同程度の IgM, IgG, IgA 膜免疫グロブリン保有細胞を有するにも拘らず、免疫反応により産生される免疫グロブリン (以下 Ig) は IgM に限られ、IgG や IgA は産生されないことを報告した。また、Wu ら<sup>2)</sup>、Hayward ら<sup>3)</sup>は、臍帯血リンパ球を *in vitro* で Pokeweed mitogen (以下 PWM) 刺激すると、成人リンパ球と同程度に分裂増殖するが、殆んど免疫グロブリン産生細胞 (以下 Ig-PC) へ分化せず、しかも分化した極く少数の Ig-PC は IgM 型であることを報告した。既に、ヒト臍帯血 T細胞が母親や他の成人リンパ球の mitogen に対する反応性に抑制的に働らくことはよく知られているが<sup>4-7)</sup>、Oldstone ら<sup>8)</sup>、Hayward ら<sup>9)</sup>は、臍帯血 T細胞が PWM で誘導される成人 B細胞の Ig-PC への分化をも著明に抑制することを報告している。このような事実から、新生児期や乳児期のヒト T細胞は、成人 T細胞と異なり、PWM 刺激により容易に抑制 T細胞へと活性化される subset を有することが示唆された<sup>9-11)</sup>。最近、我々は PWM で誘導されるこの B細胞分化抑制能は、小児の成長に伴ない漸減することを見出し<sup>12)</sup>、更に、一連の実験から PWM により誘導される臍帯血 T細胞の B細胞分化抑制能は、そのかなりの部分が臍帯

血 T細胞から分泌される透析性液性因子 (分子量 8,000 ~ 20,000) を介して働らくこと<sup>13)</sup>、その標的細胞は単球であることを明らかにした<sup>14)</sup>。

従来、ヒト B細胞の Ig-PC への分化能を知る為に PWM 刺激系が広く用いられてきたが、前述した如く PWM には新生児期、乳児期に抑制 T細胞を強く誘導する性質があり、この時期の B細胞自体の分化能を評価する上では、あまり適当でない。最近、Lethibichthuy ら<sup>15)</sup>は、ヒト末梢リンパ球を *Nocardia opaca* water soluble mitogen (以下 NWSM) で刺激すると、IgM, IgG, IgA の Ig-PC が誘導されることを報告した。また、Bona ら<sup>16)</sup>は、NWSM 刺激系において T細胞を除去して得た B細胞分画は、少量の免疫グロブリンを産生するが、T細胞を添加して培養すると B細胞の免疫グロブリン産生能が著明に増強されることを報告し、さらに PWM は末梢血の抑制 T細胞 precursor を活性化するが、NWSM はその作用を有しないと推測している。このような NWSM のサプレッサー T細胞を活性化しない特性は、小児の成長に伴なう B細胞自体の分化能の成熟過程や T細胞の調節機能の成熟過程を解析する上で、非常に有用であると思われる。

本研究では、臍帯血及び各年令の小児より得た未分画リンパ球から、NWSM 刺激により誘導される各 Ig

Maturation of B Cell Differentiation Ability and T Cell Regulatory Function during Child Growth Assessed in Nocardia Water Soluble Mitogen (NWSM) -Driven System. Takeshi Nagaoki, Department of Pediatrics (Director Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920.

- PC 数を算定し、成長に伴う推移を検討した。さらに臍帯血 B 細胞の潜在的な分化能を成人 T 細胞と NWSM 存在下で混合培養することにより、また臍帯血及び乳児 T 細胞の B 細胞分化補助能を成人 B 細胞と混合培養することにより検討した。

#### 対象および方法

##### 1. 対象

臍帯血は、聖霊病院産科に依頼し採取したが、母児とも妊娠分娩を通じ特に異常は認めなかった。臍帯血は、胎盤娩出前に臍静脈より採血した。生後 5 日から 7 日目までの新生児の採血は、ビリルビン検査時に合わせて行なった。生後 1 カ月から 12 才までの乳幼児および小児の静脈血は、小児科外来を受診した患者から家族の承諾を得た上採血した。いずれも重症感染症の既往なく、免疫抑制剤などの薬剤を服用していない患児を選んだ。成人末梢血は、当教室の健康な男子医局員より採血した。採血はいずれもヘパリン添加にて行なった。

##### 2. リンパ球の分離

ヘパリン加全血 4 容に、5% デキストランを含むリン酸緩衝液生理食塩水 (以下 PBS) 1 容を混合し、37°C 30 分静置後、白血球に富む上清を得た。上清を Boyum<sup>17)</sup>の方法に従って Ficoll - Hypaque 上に重層し、4°C、400 × G で 30 分間遠心後、中間層よりリンパ球をマイクロピペットで採取、PBS で 3 回洗浄、RPMI1640 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。

##### 3. T 細胞, B 細胞の分離

T, B 細胞は未分画リンパ球を neuraminidase 処理ヒジ赤血球 (以下 N - SRBC)<sup>18)</sup> で E ロゼット形成後、Ficoll - Hypaque 比重遠心を行ない、pellet および中間層より T, B 細胞をそれぞれ得た。N - SRBC は洗浄した SRBC ( $1 \times 10^9 / \text{ml}$ ) を *Vibrio cholerae* neuraminidase (Behringwerke, A. G.) 10 単位 / ml にて、37°C、30 分間処理後、PBS で 3 回洗浄、 $2 \times 10^8 / \text{ml}$  に調整し使用した。リンパ球浮遊液 ( $1 \times 10^7 / \text{ml}$ ) と N - SRBC ( $2 \times 10^8 / \text{ml}$ ) 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 (以下 FCS, 56°C、30 分間非働化後、37°C および 4°C にて SRBC で吸収) を 0.5 ml 加え、200 × G、5 分間遠心、その後 60 分間室温にて静置した。静置後、静かに pellet を再浮遊し、3 ~ 4 本の試験管を 1 本として、Ficoll - Hypaque 上に重層し、4°C で 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、同様の方法で

N - SRBC と混合しロゼット形成を行ない、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 ロゼット形成細胞 (以下 E - RFC) は、0.5% 以下でありかなりの単球を含んでいた。

一方、pellet のロゼット形成細胞は静かに再浮遊した後、再び Ficoll - Hypaque 比重遠心し、pellet への非ロゼット形成細胞の混入を防いだ。遠心後 T 細胞に富む pellet に 0.84%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 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、20% FCS を含む RPMI 1640 培地に再浮遊した。このようにして得られた T 細胞は、95% 以上が N - SRBC と E ロゼット形成<sup>19)</sup>を行ない、蛍光抗体法<sup>20)</sup>にて算定した細胞表面 Ig 陽性細胞の混入は 2% 以下、非特異的エステラーゼ反応<sup>21)</sup>にて算定した単球の混入は 0.5% 以下であった。

##### 4. 培養条件

リンパ球培養は、いずれも、L - glutamine ( $0.3 \text{ mg} / \text{ml}$ ), penicillin ( $200 \text{ u} / \text{ml}$ ), gentamicin ( $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), 20% の非働化済み FCS を含む RPMI1640 培地にて行なった。細胞は最終濃度  $1 \times 10^6 / \text{ml}$  とし、 $13 \times 100 \text{ mm}$  のプラスチック培養試験管 (No. 2027, Falcon) 中で 0.5 ml / tube で培養した。NWSM は、Dr. R. Ciorbaru (Institut de Biochimie, Universite de Paris - Sud, 91405 Orsay, France) より提供された Lot881 を  $100 \mu\text{g} / \text{ml}$  の至適濃度で培養に用いた<sup>15) (6) (22) (23)</sup>。NWSM の滅菌は、80°C で 3 分間加熱後<sup>24)</sup>、2 分間ソニケーター処理にて行なった。細胞は、炭酸ガス培養恒温器中で 37°C、炭酸ガス濃度 5%、空気 95% 下で、特に指摘のない限り 7 日間培養した。

##### 5. 免疫グロブリン産生細胞の検出法

B 細胞より NWSM で誘導される Ig - PC の検出は、Kearney ら<sup>25)</sup>の方法に従い、蛍光抗体法で細胞質内 Ig を染色することにより行なった。すなわち、培養後、回収された生細胞数を算定、PBS で  $1 \times 10^6 / \text{ml}$  に調整し、スライドガラス上に塗沫、直ちに冷風下で乾燥した。その後、5% 氷酢酸エタノールで -20°C、20 分間固定し、PBS でスライドガラスを十分洗浄後、FITC 標識一家兔抗ヒト Ig 血清 (IgM, IgG, IgA, Behringwerke 社、PBS で 20 倍に希釈して使用) で 30 分間染色した。細胞質内 Ig 陽性細胞は、蛍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、細胞質内 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。

## 6. ヒト B 細胞分化能の評価

種々の年齢の乳児および小児より得た未分画リンパ球から NWSM により誘導される Ig-PC 数の成長に伴う推移を、各 Ig クラスにつき検討した。さらに、臍帯血 B 細胞に、臍帯血 T 細胞或いは成人 T 細胞を T:B 比 7:3 の割合で添加後培養し、NWSM により誘導される IgM, IgG, IgA 免疫グロブリン産生細胞数を算定比較することにより、臍帯血 B 細胞の潜在的分化能を検討した。

## 7. ヒト T 細胞のもつ B 細胞分化補助能の評価

臍帯血 T 細胞或いは成人 T 細胞を、成人 B 細胞に T:B 比 7:3 の割合で加え培養し、NWSM により誘導される Ig-PC 数を IgM, IgG, IgA 各クラスにつき検討した。さらに、2才前後の乳児より得た T 細胞についても、同様の方法で T 細胞のもつ B 細胞分化補助能を検討した。

また、放射線を照射された T 細胞が、NWSM により誘導される B 細胞分化におよぼす影響につき検討した。すなわち、 $^{60}\text{Co}$  により  $\gamma$ -線を 2,000 rads 照射した臍帯血 T 細胞或いは成人 T 細胞を、成人 B 細胞に T:B 比 7:3 で加え、NWSM 存在下で 7 日間培養後、各クラスの Ig-PC 数を算定比較した。

## 成 績

### 1. 臍帯血リンパ球から NWSM 刺激により誘導される Ig 産生細胞の種類と経時的推移

$1 \times 10^6$  の臍帯血未分画リンパ球を、NWSM 存在下で、それぞれ 3 日、5 日、7 日、10 日間培養し、出現する Ig-PC 数を IgM, IgG, IgA の各 Ig クラスにつき検討した。図 1 に示したように、臍帯血リンパ球から誘導される Ig-PC は大部分が IgM を有していた。IgM-PC 数は培養開始 3 日目で、NWSM で刺激しないコントロールに比し有意に高値で、7 日目の IgM-PC 数は、 $22.9 \pm 7.1 \times 10^3$  で、成人コントロール  $150.8 \pm 32.3 \times 10^3$  に比し約 1/6 であった。一方、IgA-PC は培養 5 日目で出現し、7 日目で maximum になるものの、その絶対数は極めて低値であった。また、IgG-PC は 10 日間の培養期間を通じて殆んど認められなかった。

成人未分画リンパ球を NWSM 存在下で同様に培養すると、培養開始 3 日目より有意の Ig-PC が出現し、IgM, IgG, IgA とともに 7 日目で maximum に達した。また、NWSM 刺激により最も早期にしかも強く誘導される Ig-PC は、IgM クラスであった。一方、IgA-, IgG-PC 数は、それぞれ  $71.8 \pm 16.9 \times 10^3$ ,  $55.3 \pm 14.5 \times 10^3$  と IgM-PC に較べ低値であ

った。

このような結果から、以下の実験では Ig-PC が最も多く出現する培養開始後 7 日目に細胞を回収し、Ig-PC 数を算定した。

### 2. NWSM 刺激により末梢血リンパ球から出現する Ig 産生細胞の年齢的推移

新生児、乳児および種々の年齢の小児より得た末梢血リンパ球 ( $1 \times 10^6$ ) を、NWSM 存在下で 7 日間培養し、出現する Ig-PC 数を算出した。図 2a にみられるように臍帯血および新生児末梢血リンパ球より出現する IgM-PC 数は、成人コントロールの約 1/6 であるが、その後急速に増加し、生後 1 カ月までに成人レベル或いはそれ以上に到達し、小児期を通じて同レベルを維持した。一方、図 2b に示したように、臍帯血リンパ球の培養では殆んど認められなかった IgG-, IgA-PC は、小児の成長に伴ない次第に増加し 5 才以降に成人レベルに到達した。

### 3. 臍帯血 B 細胞の潜在的分化能

この実験系では、E ロゼット形成法により T 細胞を除去して得た一定数の臍帯血 B 細胞に、臍帯血 T 細胞或いは成人 T 細胞を T:B 比 7:3 で加え、NWSM 存在下で 7 日間培養し出現する Ig-PC 数を各 Ig クラス

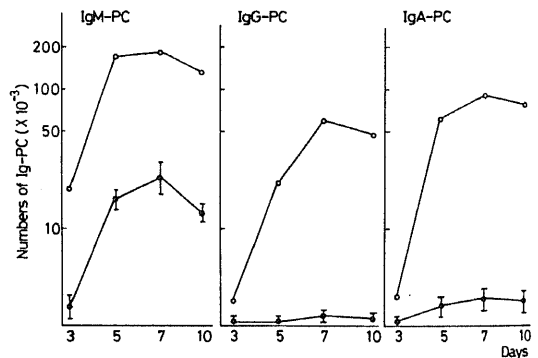


Fig. 1. Kinetics of Ig-PC generation in unfractionated cord blood lymphocytes.

Lymphocytes ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were cultured with NWSM (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for various time periods, and the generation of Ig-producing cells in cord blood lymphocytes (closed circle) and adult PBL (open circle),  $1 \times 10^6$  cells each, was enumerated. Results are expressed as the number of Ig-PC of major three immunoglobulin classes, IgM, IgG, and IgA. A number of Ig-PC was obtained after subtraction of the background value in unstimulated culture. Data represent the means  $\pm$  1 S.D. of four separate experiments.

につき検討した。表 1 に示したように、臍帯血 B 細胞単独の培養では IgM - PC は出現しなかったが、臍帯血 T 細胞を加えた場合有意に IgM - PC が増加し、その数は同数の成人 T 細胞を加えた場合に比しおよそ 50 % であった。その上、臍帯血 B 細胞に成人 T 細胞を加えた時出現する IgM - PC 数は、成人 B 細胞に成人 T 細胞を加えた時に出現した IgM - PC 数と殆んど等しかった (表 2)。これらの成績から、臍帯血 B 細胞自体に IgM - PC に分化する能力が潜在している可能性が示唆された。一方、臍帯血 B 細胞より出現する IgG -, IgA - PC は、臍帯血 T 細胞或いは成人 T 細胞のいずれを加えても殆んど認められなかった。

4. 臍帯血、乳児 T 細胞のもつ B 細胞分化補助能  
臍帯血 T 細胞を成人 B 細胞に T:B 比 7:3 で加え、NWSM 存在下で 7 日間培養し、成人 B 細胞より出現する Ig - PC を各 Ig クラスにつき検討した。表 2 にみられるように、成人 B 細胞から誘導される Ig - PC は、成人 T 細胞、臍帯血 T 細胞のいずれを加えても IgM, IgG, IgA 全ての Ig クラスで著しく増加した。臍帯血 T 細胞を加えた場合に誘導される IgM - PC 数

Table 1. Differentiation ability of cord B cells cultured with cord or adult T cells in NWSM-stimulation system<sup>a</sup>

T Cell Source	Number of Ig-PC × 10 <sup>-3</sup>		
	IgM	IgG	IgA
None	0.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	< 0.1	0.2 ± 0.1
Cord	22.8 ± 4.2	0.6 ± 0.3	2.7 ± 2.3
Adult	54.5 ± 8.4	1.8 ± 0.7	3.4 ± 0.6

<sup>a</sup> Cord or adult T cells were added to T cell-depleted B cells (1 × 10<sup>6</sup> cells/ml) in cord blood at a T : B ratio of 7 : 3, and the mixture was cultured with NWSM (100 μg/ml) for 7 days. Results are expressed as the number of Ig-PC of major three immunoglobulin classes, IgM, IgG, and IgA per culture.

<sup>b</sup> Data represent the means ± 1 S.D. of five separate experiments.

Table 2. Effect of adding T cells from cord blood and infants on adult B cell differentiation induced by NWSM<sup>a</sup>

T Cell Source	Number of Ig-PC × 10 <sup>-3</sup>		
	IgM	IgG	IgA
None	0.7 ± 0.6 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.5	1.1 ± 0.8
Cord	40.8 ± 3.7	8.9 ± 4.9	13.5 ± 3.1
Infant	47.2 ± 9.1	14.9 ± 6.6	14.9 ± 3.7
Adult	56.8 ± 9.5	40.7 ± 8.2	45.6 ± 5.9
Cord <sub>x</sub> <sup>c</sup>	18.9 ± 9.9	6.2 ± 5.6	11.0 ± 3.6
Adult <sub>x</sub>	29.2 ± 5.8	30.6 ± 5.5	18.5 ± 6.4

<sup>a</sup> Cord or infant T cells (1 × 10<sup>6</sup> cells/ml) were added to T cell-depleted B cells from adult PBL at the same ratio as described in Table 1, and these cell suspensions were cultured with NWSM (100 μg/ml) for 7 days. Results are expressed as the number of Ig-PC in regard of IgM, IgG, and IgA per culture.

<sup>b</sup> Data represent the means ± 1 S.D. of four separate experiments.

<sup>c</sup> Cord or adult T cells were irradiated with 2000 rads before adding to adult B cells.

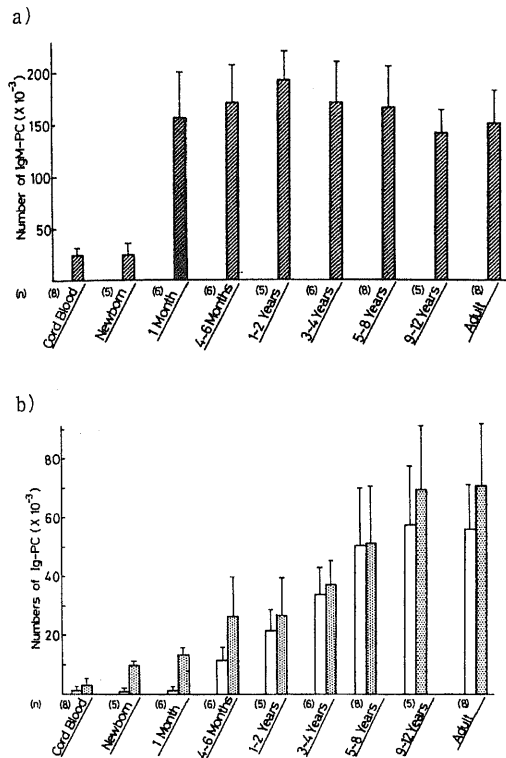


Fig. 2. The generation of Ig-PC during infancy and childhood in NWSM-stimulation system.

Unfractionated lymphocytes obtained from healthy infants and children of various ages were cultured with NWSM (100 μg/ml) for 7 days, and the generation of Ig-producing cells in 1 × 10<sup>6</sup> cells was enumerated. Results are expressed as the number of Ig-PC: a; IgM-PC (▨), b; IgG-PC (□) and IgA-PC (▤). A number of experiments was shown as (n) in each figure. Data represent the means ± 1 S.D. of several experiments.

は、同数の成人 T 細胞を加えた時とほぼ近い数値であった。しかしながら、IgG - , IgA - PC 数は同数の成人 T 細胞を添加した時に出現する Ig - PC 数の約 1/3 にすぎなかった。さらに、2 才の乳児より得た T 細胞を成人 B 細胞と同じ T:B 比で加えると、成人 B 細胞より誘導される IgM - PC 数は、同数の成人 T 細胞を加えた場合と近似した数値を示したが、IgG - , IgA - PC 数はかなり低値であった。

また、2,000rads 放射線照射した臍帯血 T 細胞或いは成人 T 細胞を成人 B 細胞に T:B 比 7:3 で加えると、成人 B 細胞より出現する Ig - PC は、B 細胞を単独で培養した場合に較べ 3 つの Ig クラス全てで増加するもの、放射線照射しない臍帯血 T 細胞および成人 T 細胞を同数加えた場合より、それぞれかなり低値であった。

### 考 察

これまで、ヒト B 細胞の分化能を解析する為に、種々の *in vitro* の方法が開発されてきた。いずれも Polyclonal B cell mitogen 存在下でリンパ球を培養する系を用いるが、主なものとして、分泌された免疫グロブリンを定量する方法<sup>26)</sup>、出現した免疫グロブリン産生細胞を算定する方法<sup>27)</sup>、抗原に対する特異的抗体産生をみる Plaque - forming cell assay<sup>28)29)</sup> などが挙げられる。しかしながら、免疫不全やヒト免疫反応の際にみられる免疫グロブリン産生を正確に解析する為には、B 細胞自体の分化能と T 細胞のもつ Helper 或いは Suppressor としての機能の両者を評価せねばならない。PWM は、これまでヒト B cell mitogen として最も研究されてきたばかりでなく、無ガンマグロブリン血症や B 細胞の個体発生上の障害を検索する上で多くの知見を提供してきた。しかし、PWM は T 細胞依存性の B cell mitogen であり<sup>30)</sup>、またある条件下で T 細胞 subset を抗体産生抑制 T 細胞へ活性化することが報告されている<sup>31)32)</sup>。臍帯血や乳児の T 細胞は、成人 T 細胞と異なり、PWM 刺激により成人 B 細胞の分化を抑制することが知られているが<sup>31)32)10)33)</sup>、我々は一連の実験から、その抑制活性は小児の成長に伴ない漸減することを報告してきた<sup>12)</sup>。このような事実は、PWM 刺激系を用いて新生児期および乳児期に潜在している B 細胞自体の分化能を評価するのは困難であることを物語っている。

末梢血リンパ球を NWSM で刺激すると、成人 B 細胞は IgM, IgG, IgA 全ての Ig - PC に分化したが、臍帯血 B 細胞から分化したのは IgM - PC のみであった。臍帯血 B 細胞より誘導された IgM - PC は、成人

コントロールに較べ約 1/6 であったが、IgG - , IgA - PC は殆んど出現しなかった(図 1)。Bird ら<sup>34)</sup>は、Plaque - forming cell assay を用い、臍帯血リンパ球が T 細胞非依存性の B cell activator である Epstein - Barr Virus (以下 EBV) によく反応し、分泌される免疫グロブリンは IgM に限られることを報告した。彼らはその中で、EBV により誘導された IgM が成人レベルに近いことから、新生児 B 細胞は IgM 産生能に関しては未熟でないことを推論した。しかしながら、Tosato ら<sup>35)</sup>は、最近、臍帯血リンパ球を EBV 存在下で培養すると、Ig - PC を誘導できるが、出現するのは IgM - PC に限られ、しかも成人に較べかなり少数であると報告している。Tosato らの成績はサブレッサー T 細胞を誘導しないと考えられる B cell mitogen である NWSM を用いた著者の実験成績と比較的よく一致している。

NWSM 刺激により末梢血リンパ球から出現する IgM - PC は、生後 1 カ月までに成人レベル或いはそれ以上に到達し、小児期を通じて同レベルを維持した(図 2a)。一方、IgG - , IgA - PC への分化能は年令に伴ない徐々に増加し、5 才以降に成人レベルに達した(図 2b)。既に宮脇ら<sup>12)</sup>は、PWM による B 細胞の IgM, IgG, IgA 産生細胞への分化能はいずれも月令に伴ない増加し、3 才頃に成人の約 1/2 に到達することを報告したが、NWSM 刺激系における小児の成長に伴ない IgG, IgA 産生能の変動は、PWM 刺激系でみられたものと類似していた。しかしながら、NWSM 系の IgM 産生能の成熟過程は、PWM と著しく異なり、生後 1 カ月で成人レベルに達するほど急速であった。

さらに NWSM 刺激系を用いて、臍帯血 B 細胞に成熟した成人 T 細胞を加える系で臍帯血 B 細胞に潜在している分化能を、また、臍帯血 T 細胞を成人 B 細胞に添加することにより臍帯血 T 細胞のもつ補助能を評価できると考えられた。臍帯血 B 細胞の IgM - PC 分化能は、成人 T 細胞を加えた場合に著しく増強し、成人 B 細胞に成人 T 細胞を添加した時の値と同レベルに達した(表 1, 2)。また、成人 T 細胞は、臍帯血 T 細胞に較べ臍帯血 B 細胞の IgM - PC 分化に対し、約 2 倍の補助能を示した。このことは、臍帯血 B 細胞の IgM 産生能は、ほぼ成人 B 細胞に近いまでに成熟しているが、臍帯血 T 細胞の補助能がなお充分でないことを物語っている。これに反して、成人 T 細胞は臍帯血 B 細胞の IgG - , IgA - PC 分化に補助能を示さなかった(表 1)。

臍帯血 T 細胞は、成人 B 細胞の IgM - PC 分化に対し成人 T 細胞とほぼ同程度の補助能を示したが、IgG

-, IgA - PC 分化に対する補助能は成人 T 細胞の約 1/3 にすぎなかった (表 2)。このような B 細胞分化におよぼす T 細胞の補助能は、年齢に伴ない増強するように思われたので、さらに 1~2 才の乳児 T 細胞を用いてその補助能を検討した。乳児 T 細胞の補助能は、成人 T 細胞と較べて、IgM - PC 誘導に関して成熟していたが、IgG -, IgA - PC に対してなお未熟であった。一方、乳児 B 細胞に成人 T 細胞を加えた場合に出現する IgG -, IgA - PC は、乳児 T 細胞を加えた時より軽度増加したが、有意の差は認められなかった。これらの成績から、乳児 B 細胞は、臍帯血 B 細胞でみられたのと同様に、成人 T 細胞の補助を受けても IgG -, IgA - PC への分化能は、なお未熟であると推測できる。

放射線照射した T 細胞を B 細胞に添加すると、PWM により誘導される免疫グロブリン産生が完全に回復することはよく知られているが<sup>31)</sup>、NWSM 刺激系においては、放射線照射した T 細胞のもつ B 細胞分化におよぼす増強効果は、照射しない T 細胞に較べかなり弱かった (表 2)。このような成績から、NWSM 系と PWM 系では、T 細胞の放射線照射が B 細胞分化におよぼす影響は異なると推測された。同様の成績が、最近マウスを用いた実験で報告されている。Goodman ら<sup>30)</sup>は、その中で Lipopolysaccharide により B 細胞から誘導される抗体産生は T 細胞添加により増強されるが、その反応は T 細胞の分裂能に依存することを明らかにしている。

NWSM は、T 細胞を除去して得た B 細胞を活性化し、免疫グロブリンを産生することが可能であり<sup>15)</sup>、PWM と異なり比較的 T 細胞依存性は低いと思われるが、Bona ら<sup>16)</sup>は、NWSM で誘導される免疫グロブリン量が、培養に加える T 細胞数に dose dependent に増加することを観察している。著者の実験でも、T 細胞を除去して得た B 細胞から NWSM 刺激により少数の Ig - PC しか誘導できなかったが、T 細胞を添加すると著しく Ig - PC が増加した。また、NWSM は、ヒトのいずれの成長段階に於ても、サプレッサー T 細胞を活性化しないようであった。

このような NWSM の特性は、PWM 刺激により非特異的サプレッサー T 細胞が誘導される新生児、乳児期の B 細胞の機能的成熟、T 細胞補助能の生理的成熟過程を解析する上で、極めて有用な mitogen と考えられる。

## 結 論

PWM には新生児、乳児期に抑制 T 細胞を強く誘導

する性質があり、この時期の B 細胞自体の分化能を評価するには不適當な点が多いので、この時期に於ても抑制 T 細胞を誘導することのない NWSM を用い、成長に伴う B 細胞、T 細胞の機能的成熟過程を解析し、以下の成績を得た。

1. NWSM 刺激により出現する臍帯血リンパ球の IgM - PC 数は有意であり、成人レベルの約 1/6 であったが、生後 1 カ月までに成人レベル或いはそれ以上に到達し、小児期を通じて同レベルを維持した。一方、IgG -, IgA - PC 数は臍帯血では殆んど出現せず、月令に伴ない徐々に増加し、5 才頃に成人レベルに達した。

2. 臍帯血 B 細胞に臍帯血 T 細胞を添加すると、IgM - PC 数は増加するが、その程度は成人 T 細胞を加えた場合の約 50% であった。IgG -, IgA - PC 数は、いずれの T 細胞を加えても増加しなかった。

3. 成人 B 細胞に臍帯血或いは成人 T 細胞を添加すると、全ての Ig - PC 数は増加した。臍帯血 T 細胞を加えた場合、IgM - PC 数は成人 T 細胞を加えた時と同程度まで増加したが、IgG -, IgA - PC 数は約 1/3 の増加に止まった。

以上より、ヒト B 細胞は、生下時すでに IgM 産生可能なまでに成熟しているが、T 細胞の IgM 産生補助能はなお弱く、新生児期に急速に成熟する。一方、IgG, IgA 産生に対する B 細胞分化能および T 細胞補助能は、生下時未熟であり、年齢とともに徐々に成熟していくと思われる。

稿を終るにあたり、終始激励し、かつ御指導と御校閲を賜った恩師谷口昂教授に心から感謝の意を表します。また、常に多大な御協力を頂きました奥田則彦講師、宮脇利男先生、森谷直樹先生はじめ小児科免疫グループの諸兄、並びに教室員の皆様に感謝いたします。最後に、長年にわたり臍帯血を御提供頂いた聖霊病院産科大下睦郎先生に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第 84 回日本小児科学会学術集会 (1981) において発表した。

## 文 献

- 1) Gathing, W. E., Lawton, A. R. & Cooper, M. D. : Immuno fluorescent studies of the development of pre - B cells, B lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans. Eur. J. Immunol., 7, 804 - 810 (1977).
- 2) Wu, L. Y. F., Blanco, A., Cooper, M. D. & Lawton, A. R. : Ontogeny of B - lymphocyte differentiation induced by pokeweed mitogen. Clin. Immunol. Immunopathol., 5, 208 - 217 (1976).

- 3) **Hayward, A. R. & Lawton, A. R.** : Induction of plasma cell differentiation of human fetal lymphocytes : evidence for functional immaturity of T and B cells. *J. Immunol.*, **119**, 1213-1217 (1977).
- 4) **Olding, L. B. & Oldstone, M. B. A.** : Lymphocytes from human newborns abrogate mitosis of their mother's lymphocytes. *Nature*, **249**, 161-162 (1974).
- 5) **Olding, L. B., Bernirschke, K. & Oldstone, M. B. A.** : Inhibition of mitosis of lymphocytes from adults by lymphocytes from human newborns. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **3**, 79-89 (1974).
- 6) **Lawler, S. D., Ukaejiofo, E. O. & Reeves, B. R.** : Interaction of maternal and neonatal cells in mixed-lymphocyte cultures. *Lancet*, **2**, 1185-1187 (1975).
- 7) **Olding, L. B. & Oldstone, M. B. A.** : Thymus-derived peripheral lymphocytes from human newborns inhibit division of their mothers' lymphocytes. *J. Immunol.*, **116**, 682-686 (1976).
- 8) **Oldstone, M. B. A., Tishon, A. & Moretta, L.** : Active thymus derived suppressor lymphocytes in human cord blood. *Nature*, **269**, 333-335 (1977).
- 9) **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).
- 10) **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).
- 11) **Durandy, A., Fischer, A. & Griscelli, C.** : Active suppression of B lymphocyte maturation by two different newborn T lymphocyte subsets. *J. Immunol.*, **123**, 2644-2650 (1979).
- 12) **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).
- 13) **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).
- 14) **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).
- 15) **Lethibichthuy, Ciorbaru, R. & Brochier, J.** : Human B cell differentiation. I. Immunoglobulin synthesis induced by Nocardia mitogen. *Eur. J. Immunol.*, **8**, 119-123 (1978).
- 16) **Bona, C., Broder, S., Dimitriu, A. & Waldmann, T. A.** : Polyclonal activation of human B lymphocytes by Nocardia water soluble mitogen (NWSM). *Immunological Rev.*, **45**, 69-92 (1979).
- 17) **Boyum, A.** : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Lab. Invest.*, **21** (Suppl. 97), 77-89 (1968).
- 18) **Galili, U. & Schlesinger, M.** : The formation of stable E rosettes after neuraminidase treatment of either human peripheral blood lymphocytes or sheep red blood cells. *J. Immunol.*, **112**, 1628-1634 (1974).
- 19) **Taniguchi, N., Miyawaki, T., Moriya, N., Nagaoki, T., Kato, E. & Okuda, N.** : Mitogenic responsiveness and monocyte-lymphocyte interaction of early and late rosette-forming cell populations of human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.*, **118**, 193-197 (1977).
- 20) **Papamichail, M., Brown, J. C. & Holborow, E. J.** : Immunoglobulins on the surface of human lymphocytes. *Lancet*, **2**, 850-853 (1971).
- 21) **Li, C. Y., Lam, K. W. & Yam, L. T.** : Esterases in human lymphocytes. *J. Histochem. Cytochem.*, **21**, 1-12 (1973).
- 22) **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).
- 23) **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).
- 24) **Forsgren, A., Svedjelund, A. & Wigzell, H.** : Lymphocyte stimulation by protein A of *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Immunol.*, **6**, 207 - 213 (1976).
- 25) **Kearney, J. F. & Lawton, A. R.** : B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes. *J. Immunol.*, **115**, 671 - 676 (1975).
- 26) **Waldmann, T. A., Broder, S., Blaese, R. M., Drum, M., Blackman, M. & Strober, W.** : Role of suppressor T cells in pathogenesis of common variable hypogammaglobulinaemia. *Lancet*, **2**, 609 - 613 (1974).
- 27) **Cooper, M. C., Lawton, A. R. & Bockman, D. E.** : Agammaglobulinaemia with B lymphocytes ; specific defect of plasma-cell differentiation. *Lancet*, **2**, 791 - 795 (1971).
- 28) **Fauci, A. S. & Pratt, K. R.** : Polyclonal activation of bone - marrow - derived lymphocytes from human peripheral blood measured by a direct plaque - forming cell assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **73**, 3676 - 3679 (1976).
- 29) **Fauci, A. S. & Pratt, K. R.** : Activation of human B lymphocytes. I. Direct plaque - forming cell assay for the measurement of polyclonal activation and antigenic stimulation of human B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **144**, 674 - 684 (1976).
- 30) **Janosy, G. & Greases, M.** : Functional analysis of murine and human B lymphocyte subsets. *Transplant. Rev.*, **24**, 12 - 236 (1975).
- 31) **Moretta, L., Webb, S. A., Grossi, C. E., Lydyard, P. M. & Cooper, M. D.** : Functional analysis of two human T - cell subpopulations : help and suppression of B - cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG. *J. Exp. Med.*, **146**, 184 - 200 (1977).
- 32) **Moretta, L., Mingari, M. C., Moretta, A. & Cooper, M. D.** : Human T lymphocyte subpopulations : studies of the mechanism by which T cells bearing Fc receptors for IgG suppress T - dependent B cell differentiation induced by pokeweed mitogen. *J. Immunol.*, **122**, 984 - 990 (1979).
- 33) **Morito, T., Bankhurst, D. & Williams, R. C. Jr.** : Studies of human cord blood and adult lymphocyte interactions with in vitro immunoglobulin production. *J. Clin. Invest.*, **64**, 990 - 995 (1979).
- 34) **Bird, A. G. & Britton, S.** : A new approach to the study of human B lymphocyte function using an indirect plaque assay and a direct B cell activator. *Immunological Rev.*, **45**, 41 - 67 (1979).
- 35) **Tosato, G., Magrath, I. T., Koski, I. R., Dooley, N. J. & Blaese, R. M.** : B cell differentiation and immunoregulatory T cell function in human cord blood lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, **66**, 383 - 388 (1980).
- 36) **Goodman, M. G. & Weigle, W. O.** : T cell regulation of polyclonal B cell responsiveness. I. Helper effects of T cells. *J. Immunol.*, **122**, 2548 - 2553 (1979).

**Maturation of B Cell Differentiation Ability and T Cell Regulatory Function during Child Growth Assessed in Nocardia Water-Soluble Mitogen (NWSM)-Driven System.** Takeshi Nagaoki, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920. — *J. J. J. Med. Soc.*, **90**, 232–240 (1981).

**Key words:** Nocardia water soluble mitogen (NWSM), Immunoglobulin, B cell differentiation ability, T cell regulatory function

#### Abstract

The generation of immunoglobulin-producing cells (Ig-PC) in peripheral blood lymphocytes from cord blood and healthy children of various ages was assessed in the *in vitro* culture system stimulated for 7 days with Nocardia water soluble mitogen (NWSM), a polyclonal B-cell activator. Ig-PC were determined by staining intracytoplasmic immunoglobulins with fluorescein-conjugated monovalent antisera against human IgG, IgM, and IgA. On stimulation with NWSM, cord blood lymphocytes produced a significant number of Ig-PC of IgM class, which were about one sixth of the adult controls. But, differentiation ability of lymphocytes into IgM-PC rapidly attained to the same as or a higher level than the adult controls at one month of life or later. The generation of IgG- as well as IgA-PC, which were hardly seen in the NWSM-stimulated cultures of cord blood lymphocytes, increased gradually with age and reached to the adult level by the age of 5 or later.

B cell-enriched population (B cells) itself, prepared by depriving of T cells by E-rosette sedimentation procedures, responded to NWSM with a poor production of Ig-PC. When cord T or adult T cells were added to cord B cells at a T:B ratio of 7:3, the generation of IgM-PC in cord B cells increased significantly. Such helper activity of cord T cells for IgM-PC production in cord B cells was roughly half that of adult T cells. Neither significant induction in IgG- nor IgA-PC was observed in cord B cells by addition of adult T or cord T cells. On the other hand, the generation of Ig-PC in adult B cells was markedly enhanced with regard to all three classes of immunoglobulins by the addition of either adult T or cord T cells. Addition of cord T cells enhanced the generation of IgM-PC in adult B cells to a similar extent as did adult T cells. But, helper effect by cord T cells for IgG- or IgA-PC generation appeared to be about one third of that exerted by the same number of adult T cells.

These results indicated that in this system, differentiation potential of human B cells into IgM-production seemed to mature at birth, but helper activity of T cells for IgM-production was rather low shortly after birth and was allowed to mature rapidly during the neonatal period. But both B cell differentiation capacity and T cell helper function for IgG- and IgA-production were still immature at birth and gradually increased with advancing age.