

Concanavalin AおよびPokeweed
Mitogen刺激により誘導されるリンパ球液性因子の
もつB細胞分化抑制能の成長に伴う推移

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/2297/8871

Concanavalin A および Pokeweed Mitogen 刺激により誘導されるリンパ球液性因子のもつ B 細胞分化抑制能の成長に伴う推移

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 谷口 昂教授)

久 保 実

(昭和55年11月21日受付)

マウスおよびヒトのリンパ球は concanavalin A (Con A) で前処理すると、種々の免疫反応に対して *in vitro* においてサプレッサー機能を発揮することが知られている。Con A で前処理したヒトリンパ球は、リンパ球のマイトジェン¹¹⁻¹⁴⁾や抗原³¹⁴⁾に対する幼若化反応、さらにリンパ球混合培養における反応¹¹⁻³¹⁾に抑制的に働くのみならず、pokeweed mitogen (PWM) により誘導されるヒト B 細胞の免疫グロブリン (Ig) 産生をも抑制することが明らかにされている⁹¹⁻⁹⁾。しかも、このような Con A により誘導されるヒトリンパ球のサプレッサー機能は、T 細胞を介して伝達されることが示されている⁸¹⁹⁾。マウス T 細胞に Con A を添加して培養すると、その培養上清はマウス脾細胞の抗体産生を著明に抑制することが報告されている¹⁰⁾。ヒトにおいても、末梢血リンパ球 (PBL) および脾細胞を Con A 存在下で培養すると、その培養上清が PWM で誘導される Ig 産生細胞への分化を抑制することが観察されている¹¹¹²⁾。

Con A により誘導されるサプレッサー細胞が全身性エリテマトーデスやその他の自己免疫疾患において欠如しており、そのことがそれらの病態と関係が深いと考えられるにいたっている¹¹¹³¹⁴⁾。また、加齢と共に Con A によって誘導されるサプレッサー T 細胞機能が著しく低下することが明らかにされている¹⁵⁾。以上のことは、Con A 誘導サプレッサー T 細胞が正常ヒト免疫反応におけるホメオスターシスの維持に1つの役割を果していることを示唆する。

ヒト臍帯血 T 細胞を成人 PBL に添加して PWM 存在下で培養すると、PWM で誘導される成人 B 細胞の

Ig 産生細胞への分化が強く抑制されることはよく知られている¹⁶⁻²¹⁾。Miyawaki ら¹⁶⁾はその抑制効果が月令とともに減弱するも、1才台まで見出されることを明らかにした。また、臍帯血 T 細胞のもつ B 細胞分化抑制能の多くは臍帯血 T 細胞より分泌される透析性液性抑制因子によって伝達されること、因子の産生には PWM の刺激が必須であることが示された²²²³⁾。しかし、新生児および乳幼児期 T 細胞が、Con A 刺激によってサプレッサー細胞に健康成人と差なく誘導されるのかどうかは知られていない。

この研究では、各月令の小児の PBL を Con A 存在下で培養して得た培養上清を成人 PBL に添加、PWM 存在下で培養し、各 Con A 刺激リンパ球培養上清のもつ成人 B 細胞分化抑制活性を比較することにより、新生児および乳幼児期における Con A で誘導されるサプレッサー細胞機能を評価した。さらに、Con A 誘導サプレッサー細胞機能と PWM 系で見出される新生児、乳児 T 細胞の B 細胞分化抑制能とを比較検討する意味で、各月令の PBL を PWM とともに培養して得た培養上清のもつ成人 B 細胞分化抑制活性を検討した。

対象および方法

1. 対象

臍帯血は聖霊病院産科に依頼して採取した。新生児は生後2日目から7日目まで、静脈血の採血はビリルビン検査時に合わせて行った。生後1ヶ月から10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児から家族の承諾の上、得た。いずれも重症感染症の既往なく、免疫抑制剤などの薬剤の服用してい

Reciprocal Changes in Suppressor Activity on B Cell Differentiation between Concanavalin A-Inducible and Pokeweed Mitogen-Inducible Humoral Lymphocyte Factors during Child Growth. Minoru Kubo, Department of Pediatrics, (Director: Prof. N. Taniguchi) School of Medicine, Kanazawa University.

ない患児を選んだ。成人末梢血は、25～32才の健康男性より採取した。採血はいずれもヘパリン添加にて行った。

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℃、30分間静置後、白血球に富む上清を得た。上清をBoyum²⁴⁾の方法に従ってFicoll-Isopaque上に重層し、400×g、4℃、30分間遠心し、中間層よりリンパ球をマイクロピペットで採取、PBSで3回洗浄後、RPMI 1640培地（GIBCO）に再浮遊した。トリパン青にて検査した生細胞率は98%以上であった。

3. T細胞の分離

T細胞は、未分画リンパ球をneuraminidase処理ヒッジ赤血球（以下N-SRBC²⁵⁾）でEロゼット形成後、Ficoll-Isopaque比重遠心を行ない、pelletに集ったT細胞に富む分画として分離した。N-SRBCは、洗浄したSRBC（ $1 \times 10^9/ml$ ）をVibrio cholerae neuraminidase（Behringwerke, A.G.）10単位/mlにて、37℃、30分間処理、PBSにて3回洗浄後、 $2 \times 10^8/ml$ に調整し使用した。リンパ球浮遊液（ $1 \times 10^7/ml$ ）とN-SRBC（ $2 \times 10^8/ml$ ）をそれぞれ数本の試験管に0.5mlずつ分注し、さらにウシ胎児血清（以下FBS、56℃30分間非働化後、37℃および4℃にてSRBCで吸収）を0.5ml加え、200×g、5分間遠心、その後60分間静置した。静置後、静かにpelletをピペティングし、3～4本の試験管を1本としてFicoll-Isopaque上に重層し、400×g、室温20分間遠心した。遠心後、T細胞に富むpelletに0.83% NH₄Cl-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% FBS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細胞分画は、90%以上（90～96%）がN-SRBCとEロゼット形成²⁶⁾を行ない、蛍光抗体法²⁷⁾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²⁸⁾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

細胞培養は、いずれも、penicillin（200u/ml）、gentamicin（10μg/ml）、20%の非働化済みFBSを含むRPMI 1640培地にて、13×100mmのプラスチック培養試験管（No.2027, Falcon）中で、最終的に1mlにして行なった。培養は炭酸ガス培養恒温器中で、37℃、炭酸ガス濃度5%下で行った。すでに成人のPBLを用いた予備実験においてPWMで誘導されるIg産生細胞数は、PWM（GIBCO）5μl/ml、7日間培養で

maximumとなることを確かめているので²⁹⁾、以下の実験はいずれもこの条件下で行った。

5. 免疫グロブリン産生細胞の検出法

B細胞よりPWMで誘導されるIg産生細胞の検出は、Kearneyら³⁰⁾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った。すなわち、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 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6/ml$ に調整し、スライドグラス上に塗抹、冷風下で乾燥した。その後、5%氷酢酸加エタノールで-20℃、20分間固定し、PBSでスライドグラスを十分洗浄後、FITC標識一家兎抗ヒトIg血清（polyvalent, IgG, IgM, IgA, Behringwerke社のものをPBSで20倍に希釈して使用）で染色した。蛍光顕微鏡下で少なくとも500個以上の細胞を観察し、細胞質内Ig陽性細胞の百分率を算定した。Ig産生細胞数は、細胞質内Ig陽性の比率と回収された生細胞数より算出して、絶対数として表わした。

6. Con Aによるリンパ球幼若化反応

臍帯血、1～3才の幼児および成人末梢血より得たリンパ球は、10% FBS加RPMI 1640培地に $5 \times 10^6/ml$ に調整し、マイクロウェル（No.3042, Falcon）に0.2mlずつ分注し、Con A（10μg/ml, Difco）を加えた後、炭酸ガス培養恒温器中で37℃、5% CO₂下で3日間培養した。培養終了24時間前に、各ウェルに0.2μCiの³H-thymidineを加え、semi-automatic multiple sample precipitatorにより培養細胞をWhatmannろ紙にharvestした。Harvest後のWhatmannろ紙は一昼夜室温に放置して乾燥させた後、シンチレーション液（PPO 5g + POPOP 100 mg/11トルエン）3mlに溶解させ、液体シンチレーションカウンターにてその放射活性を測定した。放射活性はcpmで表わした。

7. Con A刺激T細胞の作製

Con Aにより刺激された臍帯血および成人末梢血T細胞のB細胞分化に及ぼす影響は、各々のT細胞を20% FBS加RPMI 1640培地に $2 \times 10^6/ml$ に浮遊し、Con A（10μg/ml）を加えて、37℃、48時間培養した後、細胞を回収し、0.3M methyl-α-D-mannoside（Sigma）にて2回、培地にて1回洗浄してCon Aを除去した後、 5×10^6 の成人未分画リンパ球に等量添加、PWMの存在下で混合培養し、T細胞を加えない成人PBLのみの培養より出現するIg産生細胞数をコントロールとして評価した。

8. Con A刺激リンパ球培養上清の作製

Con A刺激リンパ球培養上清の作製はRichら¹⁰⁾の方法を少し改正して行った。すなわち、臍帯血、

各月令の小児および成人末梢血より得られたリンパ球を 20% FBS 加 RPMI 1640 培地に $2 \times 10^6/ml$ に調整し, Con A の存在下で, 16×125 mm のプラスチック培養管 (No. 3033, Falcon) 中にて, 5% CO_2 下で 37°C, 48 時間培養して得た. 表 1 に示した如く, 成人 PBL を用いた予備実験では, 培養上清の最終希釈濃度 1:8 の条件下において $10 \mu g/ml$ の Con A が十分な抑制活性を示す最小量であることが知られたので, 以下の実験において Con A 濃度はすべて $10 \mu g/ml$ とした. 又, 表 2 に示した如く, 3H -thymidine の取り込みを指標

Table I. Suppressor activity on PWM-induced B cell differentiation in culture supernatants of adult lymphocytes incubated with various doses of Con A.

Doses of Con A ($\mu g/ml$) ^a	Number of Ig-PC per culture $\times 10^{-3}$ ^b	
	Exp. 1	Exp. 2
Control	167	210
0	158 (95) ^c	196 (93)
0.1	173 (104)	145 (69)
1	75 (45)	138 (66)
10	45 (27)	68 (32)
50	28 (17)	41 (20)

^a Cell-free culture supernatants were prepared by incubation of adult PBL for 48 hours with various doses (0.1 to 50 $\mu g/ml$) of Con A. Each supernatant was added to autologous PBL ($1 \times 10^6/ml$) at a final dilution of 1:8 with PWM.

^b Ig-PC per culture was counted in immunofluorescence-stained cytocentrifuge preparations.

^c Percent of control culture.

Table II. The proliferative response of lymphocytes to Con A^a

Age of donor	3H -thymidine incorporation
	Mean \pm S.D. cpm ^b
Cord blood (n=3)	82,572 \pm 13,901
1-3 years (n=3)	32,300 \pm 9,578
Adult (n=3)	28,319 \pm 8,756

^a 1×10^5 PBL were cultured in the presence of Con A ($10 \mu g/ml$), pulsed with 0.2 μCi 3H -thymidine 24 hr before harvest and harvested on to glass fiber filter 3 days. The radioactivity was measured in a liquid scintillation counter. The results represent the arithmetic mean \pm S.D. of three experiments.

^b cpm, the difference of 3H -thymidine incorporation between stimulated and control cultures.

とした脐帯血, 幼児および成人 PBL の Con A による幼若化反応は, 脐帯血 82572 \pm 13901, 1~3 才の幼児 32300 \pm 9578, 成人 PBL 28319 \pm 8756cpm と, むしろ成人よりも幼児および脐帯血の方が高い傾向にあり, $10 \mu g/ml$ の Con A はリンパ球幼若化反応を惹起する十分な量であることが知られた.

遠心後得られた培養上清は等量の Sephadex G-75 (Pharmacia Fine Chemicals) にて 4°C, 1 時間の吸収を 2 回繰り返した後, $0.45 \mu m$ のミリポアフィルターにて無菌化し, 分注して -20°C に保存した. 対照上清としては培養終了時に Con A を添加したものをを用いた.

9. PWM 刺激リンパ球 培養上清の作製

PWM 刺激リンパ球培養上清の作製は, 脐帯血, 各月令の小児および成人末梢血より得たリンパ球を 20% FBS 加 RPMI 1640 培地に $3 \times 10^6/ml$ に浮遊し, Nagaoki らの方法²²⁾に従い PWM ($5 \mu l/ml$) の存在下で, 16×125 mm プラスチック培養管 (No. 3033, Falcon) 中にて, 5% CO_2 下, 37°C, 24 時間培養し, 遠心後その上清を得た. 対照上清としては, 培養終了時に PWM を添加してその上清を得た.

10. 培養上清のもつ B 細胞分化抑制活性の評価

Con A 刺激リンパ球培養上清および PWM 刺激リンパ球培養上清を 1×10^6 の成人未分画リンパ球に, それぞれ最終希釈濃度 1:8 および 1:2 となるように添加し, PWM の存在下で 7 日間培養し, 対照上清を加えた場合に出現する Ig 産生細胞数をコントロールとして各上清の B 細胞分化に及ぼす影響を評価した. Con A 刺激リンパ球培養上清については最終希釈濃度 1:16 および 1:32 についても検討した. PWM で誘導される成人 B 細胞の Ig 産生細胞への分化に及ぼす各種上清の抑制度は以下の式で算出した.

抑制度 (%)

$$= \left(1 - \frac{\text{Con A 刺激リンパ球培養上清あるいは PWM 刺激リンパ球培養上清添加時に出現する Ig 産生細胞数}}{\text{対照上清添加時に出現する Ig 産生細胞数}} \right) \times 100$$

成 績

1. 脐帯血および成人末梢血の Con A 刺激 T 細胞のもつ B 細胞分化に及ぼす添加効果

5×10^6 の成人未分画リンパ球に, Con A で刺激, あるいは未刺激の脐帯血および成人末梢血 T 細胞を等量添加し, PWM 存在下で 7 日間培養, 成人 PBL より出現する Ig 産生細胞数に及ぼす T 細胞添加による影響を検討した. Exp. 1 および Exp. 2 では, それぞれ異なる脐帯血 T 細胞および成人 T 細胞を使用した. 表

3に示した如く, Con A 刺激 T 細胞では臍帯血および成人 T 細胞の両者共に著明な B 細胞分化抑制効果が認められた. 一方, 非 Con A 刺激 T 細胞においては, 成人 T 細胞にはこのような抑制効果は認められないが, 臍帯血 T 細胞には Con A で刺激しないにもかかわらず著明な抑制効果が認められた.

2. Con A 刺激成人リンパ球培養上清のもつ B 細胞分化に及ぼす抑制効果

図 1A に示す如く, 成人 PBL を Con A の存在下で 48 時間培養して得られた培養上清を適当な濃度に希釈して培養と同時に加えると, PWM により誘導される autologous な成人 PBL の Ig 産生細胞への分化は著明に抑制された. この Con A 刺激リンパ球培養上清の最終希釈濃度 1:8 での抑制度は約 80% であった. 希釈が大となるにつれ, B 細胞分化に対する抑制度は小となった. 又, 希釈が 1:8 あるいはそれより大では回収された細胞のトリパン青による生細胞数は 82~89% と細胞障害性は小さかったが, 1:2 あるいは 1:4 では生

細胞数が 40% 以下と著明な細胞障害性を認めた. したがって, この研究では培養上清は専ら最終希釈濃度 1:8 にて行った. 一方, 培養終了時に Con A を添加した対照上清は成人 PBL の Ig 産生細胞への分化にはほとんど影響を及ぼさなかった.

表 4 に示した如く, 成人末梢血より得た Con A 刺激リンパ球培養上清の autologous な成人 PBL の Ig 産生細胞への分化に対する抑制活性は, 3 つの主な Ig のサブクラス, すなわち IgG, IgM および IgA において全く同じように認められ, しかも allogeneic な成人 PBL に対しても, 平均の抑制度が IgG 79.7 ± 11.4 , IgM 75.1 ± 12.7 , IgA 76.5 ± 17.1 と同じような抑制活性を認めた.

3. Con A 刺激臍帯血リンパ球培養上清の B 細胞分化に対する効果

臍帯血において Con A で誘導される抑制機能を明らかにする為に, 臍帯血リンパ球を Con A と共に 48 時間培養してその上清を得, 成人 PBL に種々の濃度で

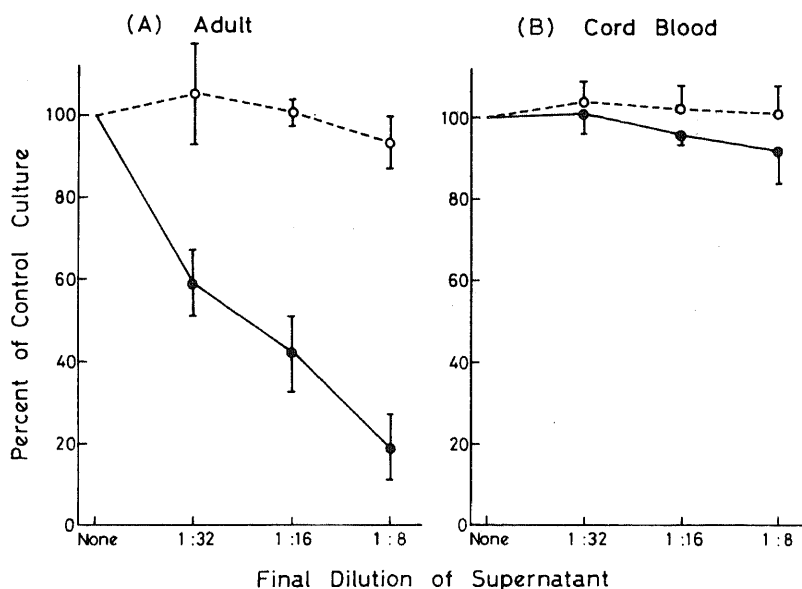


Fig. 1. Effect of Con A-activated supernatants (closed circle) and control supernatants (open circle) from adult or cord blood on PWM-induced B cell differentiation. Con A-activated supernatants were obtained by incubating PBL from adult or cord blood at a concentration of 2×10^6 /ml with Con A ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 48 hours. To prepare control supernatants, Con A was added at the end of incubation period. Supernatants from adult and cord blood were added fresh autologous or unrelated adult PBL (1×10^6 /ml), respectively, at various dilution in the presence of PWM. After cultured for 7 days, the number of Ig-PC per culture was counted in immunofluorescence-stained cyto centrifuge preparations. Results are expressed as percentage of control culture without added supernatants. Each data point represents the mean \pm SD of five experiments.

加えて PWM の存在下で培養した。成人 PBL より得た Con A 刺激リンパ球培養上清の著明な抑制活性 (図 1A) とは対照的に、脐帯血リンパ球培養上清にはこのような抑制活性はほとんど認められなかった (図 1B)。また、脐帯血リンパ球より得た対照上清にも PWM で誘導される B 細胞分化に対する抑制は認められなかった。

4. Con A 刺激リンパ球培養上清のもつ B 細胞分化

抑制活性の月令推移

各月令の小児より得た Con A 刺激リンパ球培養上清にみられる抑制活性は、PWM で誘導される成人 PBL の Ig 産生細胞への分化に対する抑制制度で評価した。得られた各々の培養上清は成人未分画リンパ球に最終濃度 1:8 となるように添加し、PWM の存在下で培養した。各試料上清の抑制制度は、異なる 2 人の成人の未分画リンパ球を用いてその平均抑制制度で示した。

Table III. Effect of Con A-stimulated or unstimulated T cells from adults and cord blood on PWM-induced B cell differentiation^a

Added cells	Con A-stimulation	Number of Ig-PC per culture $\times 10^{-3}$ ^b	
		Exp. 1	Exp. 2
None		171	148
Adult T	+	33 (19) ^c	64 (44)
Adult T	-	199 (116)	137 (93)
Cord T	+	7 (4)	32 (22)
Cord T	-	31 (18)	56 (38)

^a Equal volume of adult or cord T cells, stimulated or unstimulated with Con A ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) for 48 hours, were added to cultures containing unrelated adult PBL (5×10^5).

^b Ig-PC per culture was counted in immunofluorescence-stained cytocentrifuge preparations.

^c Percent of control culture.

Table IV. The suppressive effect of Con A-activated supernatants from adults on the generation of Ig-PC in PWM-stimulated cultures of autologous or allogeneic adult PBL

Donor	Class of Ig-PC	Type of Supernatants ^a	Number of Ig-PC per culture $\times 10^{-3}$ ^b					% Suppression ^c (Mean \pm S.D.)
			Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	
Autologous	G	Control	165	130	94	62	27	80.2 \pm 17.0
		Con A	72 (56) ^d	42 (69)	12 (88)	3 (95)	2 (93)	
	M	Control	91	151	72	62	21	72.9 \pm 14.7
		Con A	42 (54)	58 (62)	17 (76)	9 (87)	3 (86)	
	A	Control	95	70	75	45	21	76.5 \pm 15.7
		Con A	37 (61)	30 (58)	12 (84)	5 (89)	2 (90)	
Allogeneic	G	Control	150	120	32	23	123	79.7 \pm 11.4
		Con A	55 (63)	23 (82)	3 (91)	6 (74)	14 (87)	
	M	Control	90	141	14	102	151	75.1 \pm 12.7
		Con A	29 (68)	61 (58)	2 (86)	25 (76)	17 (89)	
	A	Control	92	70	20	74	78	76.5 \pm 17.1
		Con A	36 (62)	32 (54)	2 (90)	10 (87)	7 (90)	

^a Control of Con A-activated supernatants from adults were prepared as described in the legend of Figure 1. Supernatants were added to autologous as well as allogeneic adult PBL ($1 \times 10^6/\text{ml}$) at a final dilution of 1:8 with PWM.

^b Ig-PC per culture was counted in immunofluorescence-stained cytocentrifuge preparations.

^c Percent suppression was calculated as described in *Materials and Methods*.

^d Percent suppression.

表5に示す如く、臍帯血および新生児より得た Con A 刺激リンパ球培養上清の抑制度は平均でそれぞれ $10.9 \pm 8.3\%$ および $9.4 \pm 15.4\%$ で、成人より得た

もの(平均抑制度 $81.7 \pm 8.9\%$)に比べて著しく低値であった。Con A 刺激リンパ球培養上清にみられるこのような抑制活性は年令と共に次第に増強するが、1

Table V. Age-related changes of suppressor activity on PWM-induced B cell differentiation in Con A-activated supernatants^a

Age of donor		% Suppression ^b	P values ^c
		Mean \pm S.D.	
Cord blood	(n = 10)	10.9 ± 8.3	p < 0.001
Newborn	(n = 10)	9.4 ± 15.7	p < 0.001
1 month	(n = 7)	22.5 ± 7.8	p < 0.001
3-11 months	(n = 11)	28.9 ± 13.0	p < 0.001
1 year	(n = 8)	41.2 ± 13.0	p < 0.001
2-3 years	(n = 9)	52.7 ± 16.3	p < 0.01
4-10 years	(n = 13)	73.2 ± 12.8	N. S. ^d
Adult	(n = 20)	81.7 ± 8.9	

^a Con A-activated supernatants from children of various age were obtained by incubating PBL (2×10^6 /ml) with Con A for 48 hours. The suppressor activity of Con A-activated supernatants was determined by inhibition of the generation of Ig-PC in PWM-stimulated cultures of adult PBL. Con A-activated supernatants were added to cultures containing unrelated adult PBL (1×10^6 /ml) at a final dilution of 1 : 8 with PWM. The result of each supernatant sample was expressed as the mean suppression obtained from experiments using two separate adult PBL.

^b Percent suppression was calculated as described as described in *Materials and Methods*.

^c P values were obtained by Student's *t* test compared to the adult control.

^d N. S., no significant difference.

Table VI. PWM-inducible suppressor activity on PWM-induced B cell differentiation in culture supernatants of lymphocytes from children of various ages^a

Age of donor		% Suppression ^b	P values ^c
		Mean \pm S.D.	
Cord blood	(n = 6)	58.5 ± 6.7	p < 0.001
3-11 months	(n = 3)	51.5 ± 14.5	p < 0.001
1-3 years	(n = 4)	26.6 ± 10.6	p < 0.01
4-10 years	(n = 8)	16.6 ± 7.2	N.S. ^d
Adult	(n = 4)	14.7 ± 8.7	

^a Culture supernatants were obtained by incubating PBL (3×10^6 /ml) from children of various ages with PWM for 24 hr. The suppressor activity in culture supernatants was determined by inhibition of the generation of Ig-PC in PWM-stimulated cultures of adult PBL. Culture supernatants were added to cultures containing unrelated adult PBL (1×10^6 /ml) at a final dilution of 1:2 with PWM. The result of each supernatant sample expressed as the mean suppression obtained from experiments using two separate adult PBL.

^b Percent suppression was calculated as described in *Materials and Methods*.

^c P values were obtained by Student's *t* test compared to the adult control.

^d N.S., no significant difference.

～3才ではなお成人に比して有意に低かった。しかし、4才あるいはそれ以上の小児では殆ど成人のレベルに達することが判明した。

5. PWM 刺激リンパ球培養上清のもつ B 細胞分化抑制活性の月令推移

各月令の小児より得た PWM 刺激リンパ球培養上清にみられる抑制活性は、PWM で誘導される成人 PBL の Ig 産生細胞への分化に対する抑制制度で評価した。得られた各々の培養上清は成人未分画リンパ球に最終濃度 1:2 となるように添加し、PWM の存在下で培養した。各試料上清の抑制制度は、異なる 2 人の成人の未分画リンパ球を用いてその平均抑制制度で示した。表 6 に示した如く、臍帯血より得た PWM 刺激リンパ球培養上清の抑制制度は平均で $58.6 \pm 6.7\%$ と成人より得たもの (平均抑制制度 $14.7 \pm 8.7\%$) に比べて著しく高値であった。このような抑制活性は年令と共に次第に減弱し、4 才あるいはそれ以上の小児では殆ど消失した。

考 察

著者は他の研究者たちが観察したように^{9)~9)}、Con A で刺激した成人 T 細胞を添加することにより PWM によって誘導される成人 PBL の Ig 産生細胞への分化が著明に抑制され、Con A で刺激していない T 細胞を加えた場合は抑制がみられないことを確かめた。一方、臍帯血および新生児の T 細胞は、Con A で刺激しようとしまいと、それを添加することにより成人 B 細胞の Ig 産生細胞への分化は著明に抑制された。以前の研究において、新生児の T 細胞を PWM 存在下で成人未分画リンパ球に添加して混合培養した場合、PWM により誘導される成人 B 細胞分化が抑制されることが知られている^{16)~21)}。したがって、新生児および乳児の Con A 刺激 T 細胞を成人未分画リンパ球に添加して混合培養した場合の抑制機能は PWM 存在下で培養した場合にみられる T 細胞の抑制機能に妨げられて、真に Con A で誘導される抑制機能を評価することが出来ない。

Pierce ら¹⁰⁾²²⁾は、Con A で刺激したマウス T 細胞の培養上清中には soluble immune response suppressor (SIRS) と呼ばれる因子が含まれており、これが *in vitro* で抗体産生を非特異的に抑制することを示した。一方、成人 PBL あるいは脾細胞の培養上清中にも SIRS 様の因子が含まれており、それが PWM あるいは *Nocardia water soluble mitogen* により誘導される B 細胞分化を抑制する。故にこの研究では、PWM により誘導される成人 B 細胞の Ig 産生細胞への分化に対する Con A 刺激リンパ球培養上清

の抑制活性を比較することにより、臍帯血、各月令の小児および成人において Con A で誘導されるサプレッサー細胞機能の解析を試みた。

成人 PBL を Con A と共に 48 時間培養して得られた培養上清を autologous な成人 PBL に添加し、PWM の存在下で培養すると、PWM により誘導される成人 B 細胞の Ig 産生細胞への分化は著明に抑制された。回収された細胞における Con A 刺激リンパ球培養上清の細胞障害性は微弱であるので、培養上清中に見出されたこの抑制活性は反応する B 細胞に対する非特異的な細胞障害性によるものではない。成人におけるこの Con A 刺激リンパ球培養上清の抑制活性は、免疫グロブリンの主な 3 つのクラス、すなわち IgG、IgM および IgA の Ig 産生細胞への分化に対して同程度にみられる。しかも、これらの培養上清は、autologous な系でみられたと同様に allogeneic な成人 PBL の Ig 産生細胞への分化も抑制した。一方、成人より得た対照上清にはいずれもこのような抑制活性は認められなかった。特徴的なことに、成人より得られた Con A 刺激リンパ球培養上清中にみられたこのような抑制活性とは対照的に、Con A で刺激された臍帯血リンパ球の培養上清には、PWM により誘導される成人 B 細胞の Ig 産生細胞への分化に対する抑制はほとんど認められなかった。Con A 刺激リンパ球培養上清にみられるこのような抑制活性は年令と共に増強するが、1～3 才の幼児では依然として弱く、4 才あるいはそれ以上の年令でほとんど成人のレベルに達することがわかった。Phytohemagglutinin と同様に Con A によるリンパ球の幼若化反応は臍帯血や新生児においても十分発達しているらしく³³⁾³⁴⁾、著者も臍帯血および幼児のリンパ球の Con A による幼若化反応が成人 PBL に比べて決して低くないことを確かめている。これらの実験結果により、臍帯血および乳幼児においては、B 細胞分化に対する Con A で誘導される T 細胞のサプレッサー細胞への分化能が相対的に欠損していると考えられ、Con A で誘導される抑制機能が成人のレベルにまで達するには生後かなりの時間を要すると思われる。

臍帯血 T 細胞は PWM 存在下で成人未分画リンパ球に添加して混合培養すると、PWM で誘導される成人 B 細胞の Ig 産生細胞への分化を抑制する。以前の研究において Miyawaki ら¹⁶⁾は、T 細胞の抑制機能が PWM の系での成人 PBL との混合培養で評価すると、臍帯血のみならず乳児期を通じて認められることを示した。このような T 細胞の抑制機能は年令が進むに従い減弱し、2～3 才で消失する。しかも Nagaoki ら²²⁾、

Miyawaki ら²³⁾は臍帯血 T 細胞を加えることによっておこる B 細胞分化の抑制が、かなりの部分 PWM 刺激後の臍帯血 T 細胞により分泌される液性因子を介していることを示した。この PWM 刺激により臍帯血 T 細胞培養上清中に分泌される液性因子は、透析操作によりほぼ完全に除去され、単球あるいはマクロファージとの共同作用を介して PWM により誘導される B 細胞分化を抑制する²³⁾。しかもここでは、PBL を PWM 存在下で 24 時間培養し、その培養上清を用いて成人 B 細胞分化に対するこのような抑制活性が年齢と共に減弱し、やはり 4 才あるいはそれ以後には消失することを明らかにした。

Tadakuma ら³⁵⁾は、Con A 刺激マウス T 細胞の産生物である SIRS が分子量 48000 ~ 67000 の物質で、非透析性であると報告している。著者の予備実験においても、Con A 刺激成人リンパ球培養上清中にみられる抑制活性は透析操作により減弱しなかった。したがって、PWM 刺激により分泌される抑制性液性因子は Con A で刺激された T 細胞の産物と分子量の点で明らかに異なるものと考えられる。

このように新生児および乳幼児の T 細胞の抑制機能は、年齢と共に減弱する PWM で誘導される抑制機能と、逆に年齢と共に増強する Con A で誘導される抑制機能の両者によって調節されていると考えられ、このことは小児期におけるヒト T 細胞の 1 つの特異な性質と思われる。

最近 Reinherz ら³⁶⁾³⁷⁾は、Con A が TH_2^+ および TH_2^- T 細胞の両方共に幼若化反応をおこさせるが、 TH_2^+ T 細胞のみがリンパ球混合培養において反応する細胞を抑制することを示した。さらに、 TH_2^+ T 細胞サブセットは主な免疫応答においてサブプレッサー細胞を含んでおり、一方、 TH_2^- T 細胞サブセットは細胞障害性 T 細胞の分化や B 細胞の増殖および分化に対するヘルパー細胞を含んでいることを示した³⁸⁾。しかし、乳幼児期における Con A で誘導されるサブプレッサー細胞機能の欠如が、Reinherz ら³⁶⁾³⁸⁾が考えたようにある T 細胞サブセットの減少によるのかどうかは明らかでなく、今後さらに検討を要すると思われる。

結 論

臍帯血、健康な小児および成人の PBL を Con A と共に 48 時間、あるいは PWM と共に 24 時間培養し、その培養上清 (Con A 刺激リンパ球培養上清および PWM 刺激リンパ球培養上清) を得た。この研究では、この培養上清を成人未分画リンパ球に添加して PWM 存在下で培養することにより、Con A 刺激リンパ球培

養上清の B 細胞分化抑制活性を明らかにするとともに、小児期におけるこの抑制活性の推移を PWM 刺激リンパ球培養上清のもつ B 細胞分化抑制活性と比較検討し、以下の成績を得た。

成人より得た Con A 刺激リンパ球培養上清は、autologous 同様 allogeneic な成人 PBL に対しても PWM により誘導される Ig 産生細胞への分化を著明に抑制した。しかもこの抑制は、主な 3 つのクラスの Ig 産生細胞への分化に対しても全く同等に認められた。一方、臍帯血および新生児より得た Con A 刺激リンパ球培養上清に見出される成人 B 細胞の Ig 産生細胞への分化に対する抑制活性は非常に弱く、この抑制活性は年齢と共に増強するようだった。しかし、3 才台では依然として有意に弱く、4 才あるいはそれ以上で成人のレベルに達した。これとは逆に、PWM 刺激リンパ球培養上清にみられる成人 B 細胞の Ig 産生細胞への分化に対する抑制活性は臍帯血および新生児で強く、成人では殆ど認められなかった。この臍帯血で強く認められる抑制活性は年齢と共に減弱し、4 才あるいはそれ以後に消失した。

以上より小児期においては、この相互的な 2 つの抑制機能が種々の免疫応答の調節に重要な役割を果していると考えられ、ヒト T 細胞の成熟過程における特異性を示すものと思われる。

稿を終るにあたり、終始御懇篤なる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、快く臍帯血の御提供を頂いた聖霊病院産科大下睦郎先生に謝意を表し、多大な御協力を頂いた小児科免疫グループ諸先生、ならびに教室諸兄に感謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は、第 8 回日本臨床免疫学会総会 (1980) において発表した。

文 献

- 1) Sakane, T. & Green, I. : Human suppressor T cells induced concanavalin A : Suppressor T cells belong to distinctive T cell subclasses. *J. Immunol.*, **119**, 1169-1178 (1977).
- 2) Fineman, S. M., Modawwar, F. B. & Geha, R. S. : Characteristics and mechanisms of action of the concanavalin A-activated suppressor cell in man. *Cell. Immunol.*, **45**, 120-132 (1979).
- 3) Hubert, C., Delespesse, G. & Govaerts, A. : Concanavalin A-activated suppressor cells in normal human peripheral blood lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, **26**, 95-98 (1976).
- 4) Shou, L., Schwartz, S. A. & Good, R. A. : Suppressor cell activity after concanavalin A

- treatment of lymphocytes from normal donors. *J. Exp. Med.*, **143**, 1100-1110 (1976).
- 5) **Morimoto, C.** : Loss of suppressor T-lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin. Exp. Immunol.*, **32**, 125-133 (1978).
- 6) **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).
- 7) **Gupta, S., Schwartz, S. A. & Good, R. A.** : Subpopulations of human T lymphocytes. VII. Cellular basis of concanavalin A-induced T cell-mediated suppression of immunoglobulin production by B lymphocytes from normal humans. *Cell. Immunol.*, **44**, 242-251 (1979).
- 8) **Haynes, B. F. & Fauci, A. S.** : Activation of human B lymphocytes. X. Heterogeneity of concanavalin A-generated suppressor cells of the pokeweed mitogen induced plaque-forming cell response of human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.*, **121**, 559-565 (1978).
- 9) **Herscovitz, H. B., Sakane, T., Steinberg, A. D. & Green, I.** : Heterogeneity of human suppressor cells induced by concanavalin A as determined in simultaneous assays of immune function. *J. Immunol.*, **124**, 1403-1410 (1980).
- 10) **Rich, R. R. & Pierce, C. W.** : Biological expressions of lymphocyte function. III. Suppression of plaque-forming cell responses in vitro by supernatant fluids from concanavalin A-activated spleen cell cultures. *J. Immunol.*, **112**, 1360-1368 (1974).
- 11) **Sagawa, A. & Abdou, N. I.** : Suppressor-cell dysfunction in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.*, **62**, 789-796 (1978).
- 12) **Krakauer, R. S., Cathcart, M. K. & Ilfeld, D. N.** : Suppression of polyclonal immunoglobulin biosynthesis by a soluble factor : T-cell dependent and T-cell independent mitogens. *Immunology*, **40**, 53-60 (1980).
- 13) **Fauci, A. S., Steinberg, A. D., Haynes, B. F. & Whalen, G.** : Immunoregulatory aberrations in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, **121**, 1473-1479 (1978).
- 14) **Reinherz, E. L., Rubinstein, A., Geha, R. S., Strelkauskas, A. J., Rosen, F. S. & Schlossman, S. F.** : Abnormalities of immunoregulatory T cells in disorders of immune function. *New Engl. J. Med.*, **8**, 1018-1022 (1979).
- 15) **Kishimoto, S., Tomino, S., Mitsuya, H. & Fujiwara, H.** : Age-related changes in suppressor functions of human T cells. *J. Immunol.*, **123**, 1586-1593 (1979).
- 16) **Miyawaki, T., Seki, H., Kubo, M. & Taniguchi, N.** : Suppressor activity of lymphocytes from infants assessed by co-culture with unfractionated adult lymphocytes in the pokeweed mitogen system. *J. Immunol.*, **123**, 1092-1096 (1979).
- 17) **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).
- 18) **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).
- 19) **Morito, T., Bankhurst, A. D. & Williams, R. C.** : Studies of human cord blood and adult lymphocytes interactions with in vitro immunoglobulin production. *J. Clin. Invest.*, **64**, 990-995 (1979).
- 20) **Durandy, A., Fisher, A. & Griscelli, C.** : Active suppression of B lymphocyte maturation by two different newborn T lymphocyte subsets. *J. Immunol.*, **123**, 2644-2650 (1979).
- 21) **Tosata, 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).
- 22) **Nagaoki, T., Moriya, N., Miyawaki, T., Seki, H., Kubo, M., Yokoi, T., Okuda, N. & Taniguchi, N.** : Suppression of B cell differentiation by dializable humoral factors derived from pokeweed mitogen-stimulated cord T cells. *J.*

Immunol., **125**, 1563-1568 (1980).

- 23) **Miyawaki, T., Moriya, N., Nagaoki, T., Kubo, M., Yokoi, T. & Taniguchi, N.** : Mode of action of humoral suppressor factor derived pokeweed mitogen-stimulated cord T cells on adult B cell differentiation. *J. Immunol.*, **126**, 282-285 (1981).
- 24) **Boyum, A.** : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Lab. Invest.*, **21**, (Suppl. 97), 77-89 (1968).
- 25) **Weiner, M. S., Bianco, C. & Nussenzweig, V.** : Enhanced binding of neuraminidase-treated sheep erythrocytes to human lymphocytes. *Blood*, **42**, 939-946 (1973).
- 26) **Taniguchi, M., 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).
- 27) **Papamichail, M., Brown, J. C. & Holborow, E. J.** : Immunoglobulins on the surface of human lymphocytes. *Lancet*, **2**, 850-853 (1971).
- 28) **Li, C. Y., Lam, K. W. & Yam, L. T.** : Esterases in human leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.*, **21**, 1-12 (1973).
- 29) 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. 十全会誌, **89**, 291-301 (1980).
- 30) **Kearney, J. F. & Lawton, A. R.** : B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharides. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes. *J. Immunol.*, **115**, 671-676 (1975).
- 31) **Raff, H. V., Cochrum, K. C. & Stobo, J. D.** : Macrophage-T cell interactions in the Con A induction of human suppressive T cells. *J. Immunol.*, **121**, 2311-2315 (1978).
- 32) **Pierce, C. W., Tadakuma, T. & Kapp, J. A.** : Role of nonspecific and specific suppressor factors in immunity. *Am. N. Y. Acad. Sci.*, **332**, 336-344 (1979).
- 33) **Schechter, B., Handzel, Z. T., Altman, Y., Nir, E. & Levin, S.** : Cellular immunity in newborn infants and children : stimulation of lymphocyte protein synthesis as a measure of immune competence. *Clin. Exp. Immunol.*, **27**, 478-484 (1977).
- 34) **Muller, M. R., Lazary, S. & Hitzig, W. H.** : Production of migratory inhibitory factor and blast cell transformation by cord blood lymphocytes. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, **50**, 593-605 (1976).
- 35) **Tadakuma, T., Kuhner, A. L., Rich, R. R., David, J. R. & Pierce, C. W.** : Biological expressions of lymphocyte activation. V. Characterization of a soluble immune response suppressor (SIRS) produced by concanavalin A-activated spleen cells. *J. Immunol.*, **117**, 323-330 (1976).
- 36) **Reinherz, E. L. & Schlossman, S. F.** : Con A-induced suppression of MLC : evidence for mediation by the TH₂*Tcell subset in man. *J. Immunol.*, **122**, 1335-1341 (1979).
- 37) **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 as a heteroantiserum termed TH₂. *J. Immunol.*, **124**, 1301-1307 (1980).
- 38) **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).

Reciprocal Changes in Suppressor Activity on B Cell Differentiation between Concanavalin A-Inducible and Pokeweed Mitogen-Inducible Humoral Lymphocyte Factors during Child Growth Minoru Kubo, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Jusen Med. Soc.*, **89**, 788-798 (1980).

Abstract It is well known that human adult lymphocytes are activated by concanavalin A (Con A) to manifest suppressor function *in vitro*. Cord T cell is also known to suppress human B cell differentiation in the pokeweed mitogen (PWM) system. One of these suppressor mechanisms on B cell differentiation has been shown to be mediated through the secretion of soluble suppressor factors from stimulated T lymphocytes.

The present work was intended to elucidate the changing patterns of suppressor activity on B cell differentiation in Con A-stimulated and PWM-stimulated lymphocyte culture supernatants as a function of age. Cell-free culture supernatants were obtained by incubating peripheral blood lymphocytes (PBL) from cord blood, healthy children and adults with mitogenic doses of Con A for 48 hr or PWM for 24 hr. Each stimulated culture supernatant was added to the PWM-stimulated culture system of adult PBL and its suppressor activity was evaluated as a reduction in the generation of immunoglobulin-producing cells (Ig-PC) by comparing with that in the control culture containing nonstimulated lymphocyte supernatants.

Con A-activated lymphocyte supernatants from adults exerted marked suppression on the generation of Ig-PC in allogeneic as well as autologous PBL in response to PWM. Such suppression appeared to be equally effective on the generation of Ig-Pc of three major classes, IgG, IgM and IgA. But Con A-activated lymphocyte supernatants from cord blood and newborn infants showed only a negligible suppression on B cell differentiation. Con A-inducible humoral suppressor activity from PBL appeared to increase gradually with advancing age and reached approximately to the adult level by 4 years of age or later. On the contrary, culture supernatants with PWM from cord blood lymphocytes could markedly suppress the generation of Ig-PC in response to PWM. But the PWM-inducible suppressor activity in culture supernatants gradually decreased with advancing age and disappeared by 4 years of age or later.

These results suggest that age-related reciprocal changes between Con A-inducible and PWM-inducible humoral suppressor activity of lymphocytes seem to characterize a unique property of peripheral blood T lymphocytes in the developmental period of human life and may play an important role in modulating the immunoglobulin synthesizing ability to various stimuli in the early period of life.