

## 成長に伴うTリンパ球のもつB細胞分化抑制能の推移

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8832">http://hdl.handle.net/2297/8832</a>

## 成長に伴うTリンパ球のもつB細胞分化抑制能の推移

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 谷口 昂教授)

宮 脇 利 男

(昭和55年4月2日受付)

B細胞が抗体産生細胞に分化する過程において、T細胞が協調的にも、逆に抑制的にも関与することが、実験動物において明らかにされてきた<sup>1)~3)</sup>。これらの相反したT細胞の作用は、マウスの場合細胞表面のLy抗原の異なるT細胞 subsets によって発揮されることが、最近明らかとなってきた<sup>4)~6)</sup>。

Pokeweed mitogen (以下 PWM) はヒトの T, B 細胞にマイトジェンとして働くことが知られていたが、Wu ら<sup>7)</sup>、Waldmann ら<sup>8)</sup> は *in vitro* でヒト末梢血リンパ球を PWM で刺激すると免疫グロブリン (以下 Ig) 産生細胞が分化してくることを報告した。また、PWM で誘導される B 細胞の Ig 産生細胞への分化には、T 細胞の存在が必要であることが見出され<sup>9)10)</sup>、PWM を用いた系はヒトにおける T 細胞依存性抗原に対する免疫応答のよいモデルとして、広く使用されるにいたっている。Moretta ら<sup>11)~13)</sup> はヒトの末梢血 T 細胞が IgM あるいは IgG の Fc 部分に対するリセプターを有し、その多くは IgM の Fc 部分に対するリセプターをもつ T 細胞 (以下 IgM・FcR 陽性 T 細胞) で、IgG の Fc 部分に対するリセプターをもつ T 細胞 (以下 IgG・FcR 陽性 T 細胞) が少数みられることを報告した。さらに、彼等は PWM で誘導される B 細胞の Ig 産生細胞への分化に、IgM・FcR 陽性 T 細胞が補助的に働き、一方、IgG・FcR 陽性 T 細胞は IgG 免疫複合体と反応後、抑制的に働くことを見出した<sup>14)</sup>。

ヒト臍帯血 T 細胞が、母親や他の成人リンパ球のマイトジェンによる反応性に抑制的に働くことはよく知られているが<sup>15)~18)</sup>、Oldstone ら<sup>19)</sup>、Hayward ら<sup>20)</sup> は臍帯血 T 細胞が PWM で誘導される成人 B 細胞の Ig 産生細胞への分化をも著明に抑制することを報告した。Oldstone ら<sup>19)</sup> は、臍帯血中の IgG・FcR 陽性 T 細胞の比率が高いこと、母体流血中の免疫複合体の存

在が、臍帯血 T 細胞のもつ著明な抑制活性と関係が深いと推量している。が、臍帯血 T 細胞のもつ B 細胞分化抑制能が、生後どの程度の期間持続するのか明らかでない。

本研究では、臍帯血及び各月令の乳幼児末梢血より得た T 細胞のもつ B 細胞の分化に及ぼす抑制能を、成人末梢血リンパ球と各 T 細胞とを PWM 存在下混合培養することにより検討した。さらに、各月令 T 細胞中に含まれる IgG・FcR 陽性細胞の比率を算出し、T 細胞のもつ B 細胞分化抑制能と比較検討した。

## 対象および方法

## 1. 対象

臍帯血は、聖霊病院産科に依頼した採取した。新生児は生後2日目から8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3才までの乳幼児の静脈血は、小児科外来を来診した患児から、家族の承諾の上、得た。いずれも重症感染症の既応なく、免疫抑制剤などの薬剤の服用していない患児を選んだ。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、Böyum<sup>21)</sup>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、PRMI1640 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

Changing Pattern of Suppressor Activity of T Lymphocytes on B Cell Differentiation during Infancy and Childhood. **Toshio Miyawaki**, Department of Pediatrics (Director Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University.

ヒジ赤血球 (以下 N-SRBC)<sup>22)</sup> で E ロゼット形成後, Ficoll-Isopaque 比重遠心を行い, 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, PBS3 回洗浄し得,  $2 \times 10^8/ml$  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 0.5 ml ずつ分注し, さらにウシ胎児血清 (以下 FCS, 56℃ 30 分間非働化後, 37℃ 及び 4℃ にて SRBC で吸取) を 0.5 ml 加え,  $200 \times g$ , 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,  $400 \times g$ , 室温 20 分間遠心した. 遠心後 T 細胞に富む pellet に 0.83%  $NH_4Cl$  - 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, 20% FCS を含む RPMI1640 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%) N-SRBC と E ロゼット形成<sup>23)</sup> を行い, 蛍光抗体法<sup>24)</sup> にて算定した細胞表面 Ig 陽性細胞の混入は 2% 以下, 非特異物エステラーゼ反応<sup>25)</sup> にて算定した単球の混入は 0.5% 以下であった.

#### 4. IgG・FcR 陽性 T 細胞の検出法

T 細胞中に含まれる IgG・FcR 陽性細胞の検出は, Moretta ら<sup>12)</sup> の方法に従い, 家兎 IgG 分画にて感作した雄牛赤血球 (以下 EA-IgG) とのロゼット形成法にて行った. すなわち, PBS にて洗浄した雄牛赤血球を, 家兎に免疫して得た雄牛赤血球に対する IgG 抗体で感作し, PBS で 3 回洗浄後, 10% FCS 加 PBS にて  $2.5 \times 10^8/ml$  に調整した EA-IgG を作成した. T 細胞浮遊液 ( $1 \times 10^7/ml$ ) と EA-IgG ( $2.5 \times 10^8/ml$ ) を試験管中に 25  $\mu$ l ずつ混合し,  $200 \times g$ , 5 分間遠心後, 4℃ 30 分間静置した. その後, 静かに pellet を再浮遊し, マイクロピペットで 1 滴をスライドガラス上にのせ, カバーガラスで封入, 顕微鏡下で少くとも 200 ケ以上の細胞を数え, EA-IgG を 3 ケ以上附着した細胞を陽性とし, その百分率を算定した.

#### 5. 培養条件

細胞培養は, いずれも, penicillin (200u/ml), gentamicin (10  $\mu$ g/ml), 20% の非働化済み FCS を含む RPMI1640 培地にて, 13  $\times$  100 mm のプラスチック培養試験管 (No.2027, Falcon) 中で, 最終的に 1 ml にして行った. 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. 図 1, 2 で示すごとく, 成人末梢血リンパ球を用いた予備実験では, PWM

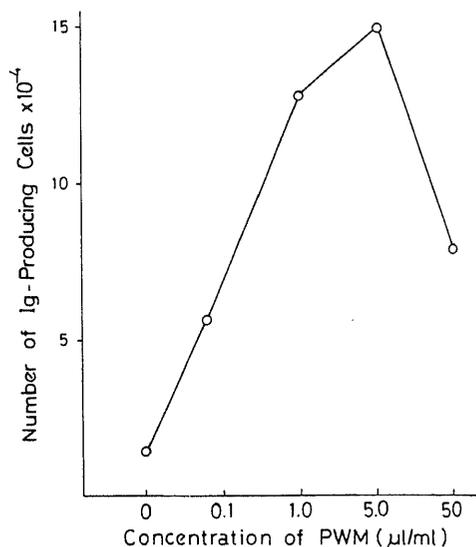


Fig.1. Generation of Ig-producing cells in adult peripheral blood lymphocytes at various doses of PWM.  $10^6$  lymphocytes per culture tube were cultured for 7 days in the presence of PWM. Ig-producing cells were counted in immunofluorescence stained cytocentrifuge preparations.

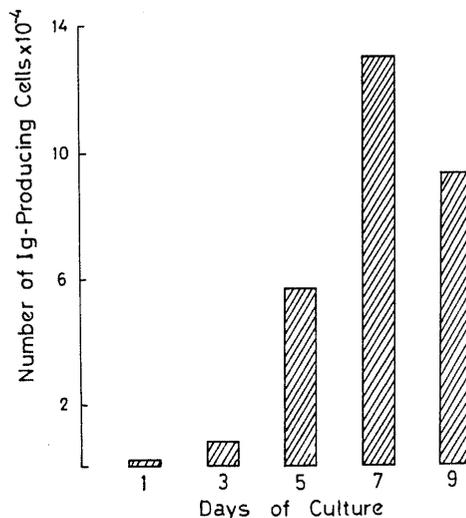


Fig.2. Kinetics of the PWM-induced differentiation of Ig-producing cells in adult peripheral blood lymphocytes.  $10^6$  lymphocytes were cultured in a concentration of 5  $\mu$ l/ml of PWM. Ig-producing cells were examined various days after culture.

で誘導されるIg産生細胞数は、PWM (GIBCO) 5 $\mu$ l/ml, 7日間培養でmaximumとなったので、以下の実験はいずれもこの条件で行った。

#### 6. 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<sup>26)</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<sup>6</sup>~2 $\times$ 10<sup>6</sup>/mlに調整し、スライドグラス上に塗布、冷風下で乾燥した。その後、5%氷酢酸エタノールで-20 $^{\circ}$ 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社のものPBSで20倍に希釈して使用)で染色した。蛍光顕微鏡下で少くとも500ヶ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。

#### 7. T細胞のもつB細胞分化抑制能の評価

臍帯血及び各月令T細胞のB細胞の分化に及ぼす影響は、原則として各々のT細胞を5 $\times$ 10<sup>5</sup>の成人未分画リンパ球に等量添加、PWM存在下混合培養し、T細胞を加えない成人リンパ球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。臍帯血T細胞については、成人リンパ球の2分の1量、等量、倍量を加えたばあい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T細胞の抑制能は以下の式で算出した。

$$\text{抑制度 (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{T細胞添加培養で出現する Ig 産生細胞数}}{\text{成人未分画リンパ球のみの培養で出現する Ig 産生細胞数}} \right) \times 100$$

#### 成 績

##### 1. IgG・FcR陽性T細胞の月令推移

臍帯血及び各月令のT細胞中に占めるIgG・FcR陽性細胞の比率は、表1に示した。未分画リンパ球よりN-SRCを用いたEロゼット比重遠心法により分離したT細胞に富む分画は、90%以上のEロゼット形成細胞を含むもので、ここでの結果はT細胞の実際値を反映しているものと思われる。臍帯血のIgG・FcR陽性T細胞の比率は、成人平均9.2 $\pm$ 2.9%に比べ、28.4 $\pm$ 12.1%と約3倍高かった(p<0.001)。このIgG・FcR陽性T細胞の高い比率は、新生児、1ヶ月の乳児でもみられた。一方、3ヶ月以後の乳幼児より得たT細胞中に占めるIgG・FcR陽性細胞の割合は、成人平均と有意な差は認めなかった。

##### 2. PWM刺戟により末梢血リンパ球に出現する免疫グロブリン産生細胞の頻度の月令推移

1 $\times$ 10<sup>6</sup>の臍帯血リンパ球及び各月令の末梢血をPWM存在下7日間培養し、培養後出現するIg産生細胞数を算出した。それぞれの培養後回収される培養試

表1. The percentage of Fc (IgG) receptor-bearing T cells in T cell-enriched population from children of various ages

Age of Donor	EA-IgG RFC <sup>a</sup> in T cells	p values <sup>b</sup>
Cord blood (n=9)	mean $\pm$ S.D.% 28.4 $\pm$ 12.1	p<0.001
Newborn (n=7)	17.6 $\pm$ 9.2	p<0.05
1 month (n=4)	17.5 $\pm$ 8.2	p<0.05
3 months (n=7)	10.2 $\pm$ 4.9	N.S. <sup>c</sup>
6-11 months (n=5)	11.6 $\pm$ 3.0	N.S.
1 year (n=6)	11.3 $\pm$ 8.0	N.S.
2 years (n=4)	7.5 $\pm$ 2.1	N.S.
3 years (n=5)	7.3 $\pm$ 3.5	N.S.
Adult (n=10)	9.2 $\pm$ 2.9	

<sup>a</sup> EA-IgG RFC, EA-IgG rosette-forming cells.

<sup>b</sup> p values obtained by Student's *t*-test compared with adult controls.

<sup>c</sup> N.S., not significant.

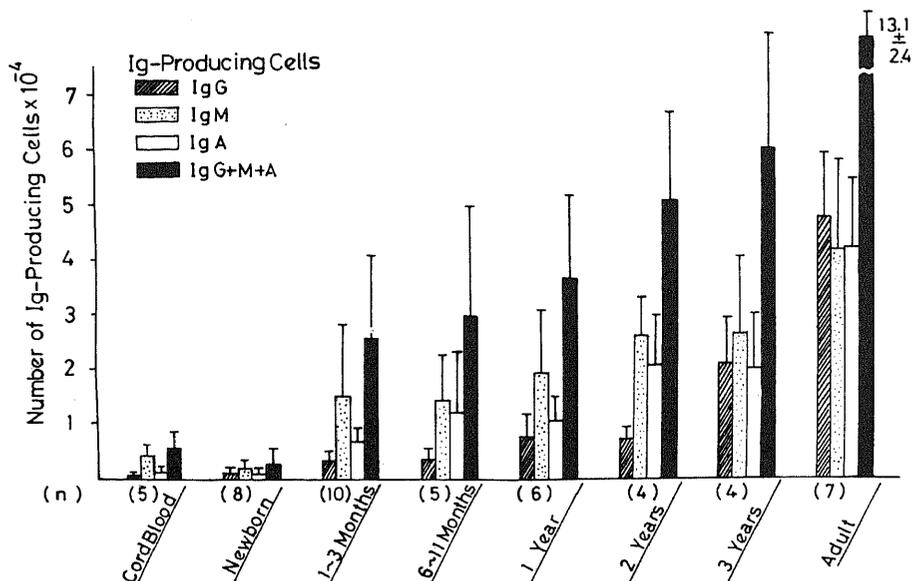


Fig.3. Generation of the PWM-induced Ig-producing cells in unfractionated lymphocytes at various ages.  $10^6$  unfractionated lymphocytes from cord blood and from children of various ages were cultured for 7 days in the presence of PWM. Data represent the means ( $\pm$ S.D.) of the total number of Ig-producing cells per culture.

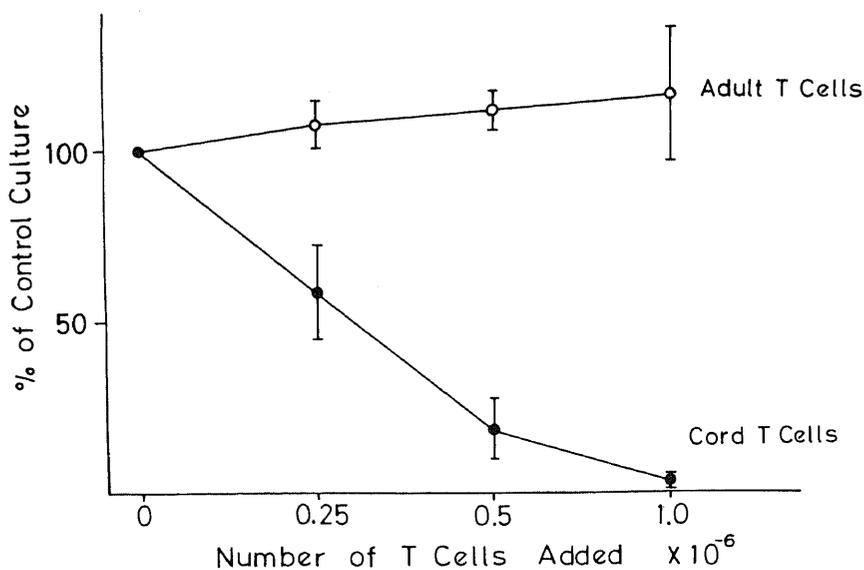


Fig.4. Effect of the addition of T lymphocytes from cord blood or adults on the PWM-induced differentiation into Ig-producing cells by unfractionated adult lymphocytes. Different numbers of T cells from each donor were co-cultured with  $5 \times 10^6$  unfractionated adult lymphocytes for 7 days in the presence of PWM. Results are expressed as percentage of control culture without added T cells. Data represent the means ( $\pm$ S.D.) of five separate experiments.

験管あたりの生細胞数は、臍帯血で  $10.5 \pm 2.0 \times 10^5$ 、新生児で  $11.6 \pm 4.0 \times 10^5$ 、3才までの乳幼児では  $10.4 \pm 2.6 \times 10^5$  で、成人平均 ( $9.1 \pm 2.5 \times 10^5$ ) と比較して有意の差はなかった。図3でみられるように、PWM 刺激で誘導される Ig 産生細胞数は、臍帯血リンパ球や新生児末梢血リンパ球のばあい、成人リンパ球に比べきわめて低値であったが、1~3ヶ月より漸時 Ig 産生細胞数は増加し、3才時で、IgG、IgM、IgA 産生細胞の総数で  $5.9 \pm 3.3 \times 10^4$  で、成人平均 ( $13.1 \pm 2.4 \times 10^4$ ) の約2分の1に達する。臍帯血、新生児リンパ球より出現する主たる Ig 産生細胞は、IgM クラスであった。一方、成人のばあい、各クラスの Ig 産生細胞はほぼ同率に出現した。月令とともに、IgG 及び IgA クラスの Ig 産生細胞の頻度は増加し、相対的に IgM クラスの比率が減少し、3才台ではほぼ成人のパターンになるようであった。

### 3. 臍帯血 T 細胞のもつ成人 B 細胞の分化に及ぼす抑制能 (図4)

$5 \times 10^5$  の成人未分画リンパ球に臍帯血 T 細胞を、2分の1量、等量、倍量添加し、PWM とともに7日間培養、成人リンパ球より出現する Ig 産生細胞数に及ぼす T 細胞添加の影響を検討した。成人リンパ球より出現する Ig 産生細胞数には個人差がみられるので、臍帯血 T 細胞を加えない成人リンパ球の培養を 100% とし結果を表示した。図4に示すごとく、各量の臍帯血 T 細胞を添加すると、PWM 刺激により成人リンパ

球から出現する Ig 産生細胞は dose-dependent に減少し、倍量の T 細胞の添加でほぼ 100% に近い抑制が認められた。一方、対照として他の成人 T 細胞を加えた場合は、Ig 産生細胞の出現頻度にはほとんど影響ないか、むしろやや増強する傾向にあった。さらに、この臍帯血 T 細胞のもつ成人 B 細胞分化抑制能を各クラス別の Ig 産生細胞について比較すると、図5に示すごとく、IgG、IgM、IgA、それぞれほぼ同程度に抑制がみられるようであった。

### 4. T 細胞のもつ成人 B 細胞分化抑制能の月令推移 (図6)

臍帯血 T 細胞に認められる成人 B 細胞分化抑制能が生後どの程度の期間持続するのかを明らかにする目的で、 $5 \times 10^5$  の成人未分画リンパ球に3才までの乳幼児末梢血より得た T 細胞を等量加え、7日間 PWM 存在下混合培養し、成人 B 細胞の Ig 産生細胞への分化に及ぼす T 細胞添加の影響をみた。抑制度は、T 細胞を加えない成人リンパ球の培養をコントロールとして、PWM で誘導される Ig 産生細胞数の減少率で表わした。成人リンパ球に臍帯血 T 細胞を等量加えることにより、Ig 産生細胞の出現は約 80% 抑制されたが、生後2~8日目の新生児末梢血より分離した T 細胞にも 77% の抑制活性が認められた。3ヶ月時の T 細胞にも約 55% の抑制がみられ、その後月令とともに T 細胞のもつ成人 B 細胞分化抑制は減少するが、1才台でもなお弱い抑制が検出可能であった。2~3才台の T

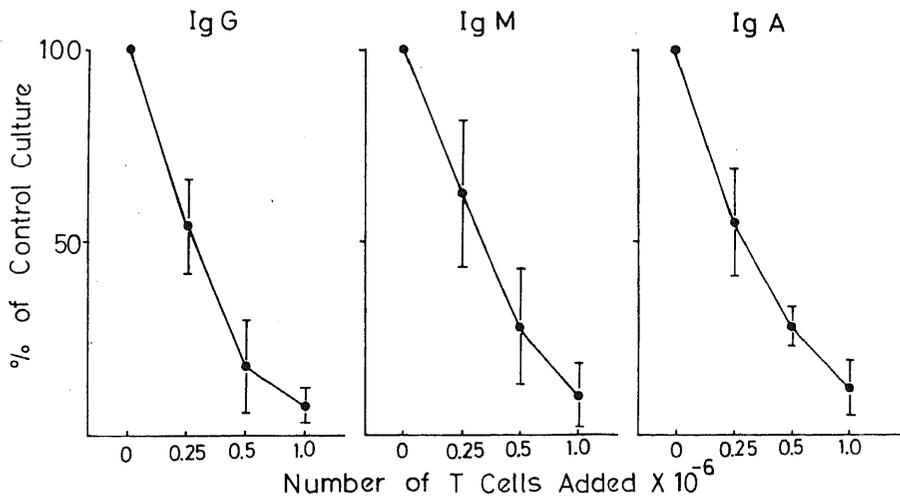


Fig.5. The suppressive effect of cord T lymphocytes on the occurrence of three major classes, gG; IgM, and IgA in the PWM-stimulated cultures of unfractionated adult lymphocytes. Results are expressed as percentage of control culture. The means ( $\pm$ S.D.) of three separate experiments are shown for each Ig class.

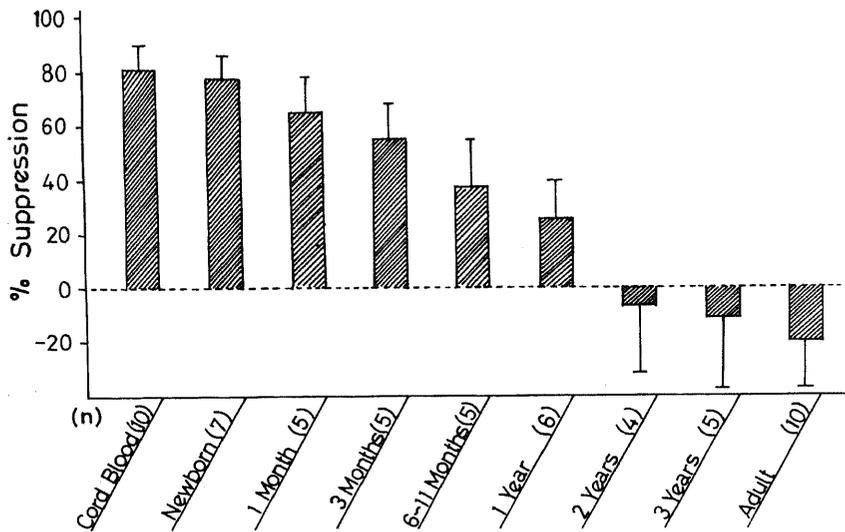


Fig.6. The suppressive effects of T lymphocytes from children of various ages on the PWM-induced differentiation into Ig-producing cells by unfractionated adult lymphocytes.  $5 \times 10^5$  T cells from each donor were added to cultures containing  $5 \times 10^5$  adult lymphocytes in the presence of PWM. Results are expressed as percentage of suppression compared with control culture without added T cells. Negatives indicate an increase in number of Ig-producing cells. Each column represent the mean ( $\pm$ S.D.) of suppression.

細胞には、B細胞のIg産生細胞への分化に及ぼす抑制活性はもはや認められなかった。

#### 考 察

実験動物における新生児期のT細胞が、B細胞の抗体産生細胞への分化過程に抑制的に働くことは、ラット<sup>27)</sup>、マウス<sup>28)-30)</sup>、ニワトリ<sup>31)</sup>などで多くの報告のみられるところである。ヒト臍帯血の抑制T細胞の存在は、Oldingら<sup>15)16)18)</sup>の一連の研究で明らかにされた。Oldingら<sup>15)16)</sup>は男児臍帯血リンパ球と母親及び非妊娠女性リンパ球とをマイトゲン存在下で混合培養し、性染色体を指標にして、成人リンパ球の反応性に及ぼす臍帯血リンパ球の影響をみて、臍帯血リンパ球が成人リンパ球の分裂、増殖を著明に抑制することを報告した。さらに、このような臍帯血のもつ抑制の多くはT細胞によることを見出した。<sup>16)</sup> Oldstoneら<sup>19)</sup>やHaywardら<sup>20)</sup>は臍帯血T細胞が成人リンパ球の分裂、増殖のみならず、PWMで誘導される成人リンパ球のIg産生細胞への分化にも抑制的に働くことを報告した。著者は、臍帯血T細胞、さらには3才までの乳幼児末梢血より得たT細胞を成人未分画リンパ球に加え、PWM存在下で混合培養し、成人B細胞のIg産

生細胞への分化に及ぼすT細胞添加の影響を検討した。成人リンパ球より出現するIg産生細胞数は、臍帯血及び新生児のT細胞を添加することにより著明に抑制された。さらに、T細胞のもつ成人B細胞分化抑制能は、臍帯血、新生児のみならず、月令とともに減少する傾向にあるが、1才台のT細胞にまで検出できた。2~3才台でこの抑制活性はほぼ消失するようであった。Calkinら<sup>22)</sup>は新生児マウスT細胞が非特異的に成熟マウス脾細胞の抗体産生を著しく抑制するが、この抑制活性は3週マウスには認められなかったとしている。

臍帯血リンパ球及び新生児末梢血リンパ球よりPWM刺激でin vitroに出現してくるIg産生細胞数は、成人のばあいと比べて著しく少数であった。また、この時期ではIgGとIgA産生細胞の出現頻度はIgMクラスに比べ相対的に少ないようであった。このことは、Wuら<sup>32)</sup>やHaywardら<sup>20)</sup>も指摘しているところである。PWMで誘導されるIg細胞の出現頻度は、月令とともに増加し3才台のリンパ球では成人平均のほぼ2分の1に達した。さらに、3才では総Ig産生細胞数は成人レベルの2分の1のみであるが、各クラス別の割合は成人でみられるようにほぼ同程度であった。臍

帯血を含めて新生児期にはすでに成人に匹敵する相当量の B 細胞が存在することはよく知られている<sup>34)35)</sup>。PWM で誘導される B 細胞の分化には T 細胞の存在が必要であるが<sup>31)</sup>、新生児リンパ球の Ig 産生細胞への分化が少ない原因として B 細胞自体の未熟性も予想される。が、Hayward ら<sup>20)</sup>は、臍帯血 B 細胞に自からの T 細胞の代わりに成人末梢血 T 細胞を添加することにより、PWM 刺戟で出現する Ig 産生細胞数は増加することを見出した。彼らは、新生児 B 細胞の分化能の低い原因として、新生児 T 細胞の補助能の低下、ならびに B 細胞分化抑制能の亢進状態を挙げている。著者は、末梢リンパ球より PWM 刺戟で分化してくる Ig 産生細胞は月令につれて増加する一方、成人 B 細胞の分化を指標として評価した T 細胞の抑制活性は月令とともに減少することを明らかにした。このことは、新生児、乳幼児 B 細胞の PWM に対する反応に、自らの T 細胞の抑制活性がなんらかの影響を及ぼしている可能性を示唆するものと思われる。生後のヒトの免疫グロブリンの血清値は、臍帯血では経胎盤的に IgG 値が高値を示し、2~3ヶ月で低値となり、その後自らの免疫グロブリン産生とともに増加するが、成年のレベルに達するにはなお数年を要する<sup>36)37)</sup>。ここで示した PWM で誘導される Ig 産生細胞の月令推移は、生後の免疫グロブリン値の推移とよく相関するようであり、B 細胞の PWM に対する *in vitro* の反応性は生体内での免疫グロブリン産生能をよく反映するのかもしれない。

Moretta ら<sup>14)</sup>は成人末梢より得た IgG・FcR 陽性 T 細胞が IgG-免疫複合体と反応後、PWM で誘導される B 細胞の分化過程に抑制的に働くことを見出した。さらに、末梢血の IgG・FcR 陽性 T 細胞の比率の高い無ガンマグロブリン血症の症例を報告し、その症例の IgG・FcR 陽性 T 細胞も B 細胞の分化を著明に抑制することを示した。本報では、臍帯血ならびに新生児 T 細胞中に占める IgG・Fc 陽性細胞の比率が高いことを明らかにした。Oldstone ら<sup>19)</sup>は、臍帯血 T 細胞のもつ著明な B 細胞分化抑制能は妊婦の流血中にみられる Ig 免疫複合体により活性化された IgG・FcR 陽性 T 細胞の比率が高いことによると推量している。臍帯血ならびに新生児でみられる IgG・FcR 陽性 T 細胞の高い比率は、生後 3ヶ月の T 細胞ではすでに認めなかった。一方、成人 B 細胞の分化を指標にして評価した T 細胞のもつ抑制活性は、3ヶ月目でなお強く、1才台でも弱い活性が認められた。従って、本研究の実験結果より、乳児期の T 細胞の抑制活性は、Oldstone ら<sup>19)</sup>のいういわゆる活性化された IgG・FcR 陽性 T

細胞の存続のみで説明できないと考えられた。

最近、当教室の森谷ら<sup>38)</sup>は、臍帯血 T 細胞を EA・IgG を用いたロゼット比重遠心法により、IgG・FcR 陽性 T 細胞分画と IgG・FcR 陰性分画に分ち、それぞれの成人 B 細胞の分化に及ぼす影響をみて、臍帯血 T 細胞のもつ B 細胞分化抑制能の多くは IgG・FcR 陽性 T 細胞よりもむしろ IgG・FcR を欠く T 細胞群によることを報告した。この事実は、Hayward ら<sup>39)</sup>や Durandy ら<sup>40)</sup>の最近の論文の中でも確かめられた。成熟マウスにおいて、マイトジェンや抗原刺戟で誘導される抑制 T 細胞は Ly1<sup>-</sup>, 2, 3<sup>+</sup> の表現型を有することが明らかとなっているが<sup>45)</sup>、Mosier ら<sup>41)</sup>は新生児マウス T 細胞の抑制は Ly1<sup>+</sup>, 2, 3<sup>+</sup> の表現型を有するユニークな細胞集団によることを報告した。

ヒトの新生児、乳幼児にみられる B 細胞分化抑制能を有する T 細胞の性状ならびに免疫学的意義についてさらに検討が必要と思われる。

## 結 論

臍帯血ならびに各月令の乳幼児末梢血より得た T 細胞のもつ B 細胞分化抑制能を、各 T 細胞を成人末分画リンパ球に添加、PWM 存在下で混合培養することにより検討した。さらに家兎 IgG 分画で感作した雄牛赤血球を用いたロゼット法により、各 T 細胞中に含まれる IgG・FcR 陽性の比率を算出し、T 細胞のもつ B 細胞分化抑制能と比較検討し、以下の成績を得た。

1. 臍帯血及び新生児 T 細胞を添加することにより、PWM 刺戟により誘導される成人 B 細胞の分化は、著明に抑制された。臍帯血 T 細胞の抑制は、IgG, IgM, IgA 各クラスの Ig 産生細胞の出現にほぼ同程度にみられるようだった。このような T 細胞のもつ抑制効果は、月令とともに減少し、1才までに観察され、2才台でほぼ消失した。PWM 刺戟により末梢血リンパ球より出現する Ig 産生細胞は、臍帯血、新生児できわめて少ないが、月令とともに増加し、3才台で成人レベルの約 2分の1に達した。以上のことにより、PWM で誘導される乳幼児 B 細胞の分化は、自らの T 細胞のもつ抑制効果によりなんらかの影響を受けているものと考えられる。

2. 臍帯血の IgG・FcR 陽性 T 細胞の比率は成人に比べ約 3倍高かった。が、3ヶ月までに成人の比率にまで低下し、その後有意の増減はなかった。一方、T 細胞のもつ B 細胞分化抑制能は 3ヶ月でなお強く、1才台まで認められたので、IgG・FcR 陽性 T 細胞の比率は直接的に T 細胞のもつ B 細胞分化抑制能を反映していないようであった。

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、快く脐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、本論文の要旨は、第7回日本臨床免疫学会総会(1979)において発表した。

- 1) **Gershon, R. K.** : T cell control of antibody production. *Contemp. Top. Immunobiol.*, **3**, 1 - 40(1974).
- 2) **Gershon, R. K.** : A disquisition on suppressor T cells. *Transplant. Rev.*, **26**, 170 - 185(1975).
- 3) **Cantor, H. & Weissman, I.** : Development and function of subpopulations of thymocytes and T lymphocytes. *Prog. Allergy*, **20**, 1 - 64(1976).
- 4) **Jandinski, J., Cantor, H., Tadakuma, T., Peavy, D. L. & Pierce, C. W.** : Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. I. Polyclonal activation : suppressor and helper activities are inherent properties of distinct T-cell subclasses. *J. Exp. Med.*, **143**, 1382 - 1390(1976)
- 5) **Cantor, H., Shen, F. W. & Boyse, E. A.** : Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components : II. Activation by antigen : after immunization, antigen-specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T-cell subclasses. *J. Exp. Med.*, **143**, 1391 - 1400(1976).
- 6) **Cantor, H. & Gershon, R. K.** : Immunological circuits : cellular composition. *Fed. Proc.*, **38**, 2058 - 2064(1979).
- 7) **Wu, L. Y. F., Lawton, A. R. & Cooper, M. D.** : Differentiation capacity of cultured B lymphocytes from immunodeficient patients. *J. Clin. Invest.*, **52**, 3180 - 3189(1973)
- 8) **Waldmann, T. A., Durm, M., Broder, S., Blackman, M., Blaese, R. M. & Strober, W.** : Role of suppressor T cells in pathogenesis of common variable hypogammaglobulinemia. *Lancet*, **2**, 609 - 613(1974).
- 9) **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).
- 10) **Saxon, A., Stevens, R. H. & Ashman, R. F.** : Regulation of immunoglobulin production on human peripheral blood leucocytes : cellular interactions. *J. Immunol.*, **118**, 1872 - 1879(1977).
- 11) **Moretta, L., Ferrarini, M., Durante, M. L. & Mingari, M. C.** : Expression of a receptor for IgM by human T cells *in vitro*. *Eur. J. Immunol.*, **5**, 565 - 569(1975).
- 12) **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).
- 13) **Moretta, L., Mingari, M. C., Webb, S. R., Pearl, E. R., Lydyard, P. M., Grossi, C. E., Lawton, A. R. & Cooper, M. D.** : Imbalances in T cell subpopulations associated with immunodeficiency and autoimmune syndromes. *Eur. J. Immunol.*, **7**, 696 - 700(1977).
- 14) **Moretta, L., Webb, S. R., 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).
- 15) **Olding, L. B. & Oldstone, M. B. A.** : Lymphocytes from human newborns abrogate mitosis of their mothers' lymphocytes. *Nature*, **249**, 161 - 162(1974).
- 16) **Olding, L. B., Benirschke, K. & Oldstone, M. B. A.** : Inhibition of mitosis of lymphocytes from human adults by lymphocytes from human newborns. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **3**, 79 - 89(1974).
- 17) **Lawler, S. D., Ukaejiofo, E. O. & Reeves, B. R.** : Interaction of maternal and neonatal cells in mixed-lymphocyte cultures. *Lancet*, **2**, 1185 - 1187(1975).
- 18) **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).
- 19) **Oldstone, M. B. A., Tishon, A. & Moretta, L.** : Active thymus derived suppressor lymphocytes in human cord blood. *Nature*, **269**, 333 - 335(1977).
- 20) **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).
- 21) **Boyum, A.** : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Lab. Invest.*, **21** (Suppl. 97), 77-89(1968).
- 22) **Weiner, M. S., Bianco, C. & Nussenzweig, V.** : Enhanced binding of neuraminidase-treated sheep erythrocytes to human T Lymphocytes. *Blood*, **42**, 939-946(1973).
- 23) **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).
- 24) **Papamichail, M., Brown, J. C. & Holborow, E. J.** : Immunoglobulins on the surface of human lymphocytes. *Lancet*, **2**, 850-853(1971).
- 25) **Li, C. Y., Lam, K. W. & Yam, L. T.** : Esterases in human leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.*, **21**, 1-12(1973).
- 26) **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).
- 27) **Folsh, H. & Waksman, B. H.** : The splenic suppressor cells. I. Activity of thymus-dependent adherent cells : changing with age and stress. *J. Immunol.*, **113**, 127-139(1974).
- 28) **Mosier, D. E. & Johnson, B. M.** : Ontogeny of mouse lymphocyte function. II. Development of the ability to produce antibody is modulated by T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **141**, 216-226(1975).
- 29) **Morse, H. C., Prescott, B., Cross, S. S., Stashak, P. W. & Baker, P. J.** : Regulation of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide. V. Ontogeny of factors influencing the magnitude of the plaque-forming cell response. *J. Immunol.*, **116**, 279-287(1976).
- 30) **Hardy, B. & Mozes, E.** : Expression of T cell suppressor activity in the immune response of newborn mice to a T-independent synthetic polypeptide. *Immunology*, **35**, 757-762(1978).
- 31) **Droege, W.** : The antigen-inexperienced thymic suppressor cells : a class of lymphocytes in the young chicken thymus that inhibits antibody production and cell-mediated immune responses. *Eur. J. Immunol.*, **6**, 279-287(1976).
- 32) **Calkins, C. E. & Stutman, O.** : Changes in suppressor mechanisms during postnatal development in mice. *J. Exp. Med.*, **147**, 87-97(1978).
- 33) **Wu, L. Y. F., Blanco, A., Cooper, M. D. & Lawton, A. R.** : Ontogeny of B-lymphocytes differentiation induced by pokeweed mitogen. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **5**, 208-217(1976).
- 34) **Campbell, A. C., Waller, C., Wood, J., Aynsley-Green, A. & Yu, V.** : Lymphocyte subpopulations in the blood of newborn infants. *Clin. Exp. Immunol.*, **18**, 469-482(1974).
- 35) **Ugazio, A. G., Marcinoni, A. F., Astaldi, A. Jr. & Burgio, G. R.** : Peripheral blood B lymphocytes in infancy and childhood. *Acta Paediat. Scand.*, **63**, 205-208(1974).
- 36) **West, C. D., Hong, R. & Holland, N. H.** : Immunoglobulin levels from the newborn period to adulthood and in immunoglobulin deficiency states. *J. Clin. Invest.*, **41**, 2054-2064(1962).
- 37) **Stiehm, E. R. & Fudenberg, H. H.** : Serum levels of immune globulins in health and disease : A survey. *Pediatrics*, **37**, 715-726(1966).
- 38) **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).
- 39) **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).

- 40) 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).
- 41) 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).

**Changing Pattern of Suppressor Activity of T Lymphocytes on B Cell Differentiation during Infancy and Childhood** Toshio Miyawaki, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Jusen Med. Soc.*, **89**, 291-301 (1980).

**Abstract** The present study was undertaken to determine the existence of suppressor activity of T lymphocytes on pokeweed mitogen (PWM)-induced B cell differentiation in infancy. T lymphocytes were isolated by E rosette sedimentation from cord blood lymphocytes and from the peripheral blood lymphocytes of healthy children of various ages. In addition, each donor was examined for the relative proportion of Fc (IgG) receptor-bearing T cells in the T cell-enriched population to compare with the suppressor activity of T lymphocytes.

1. The suppressor activity of T lymphocytes was evaluated by co-culture with unfractionated adult lymphocytes on the *in vitro* PWM system. The PWM-induced differentiation of adult B lymphocytes into immunoglobulin (Ig)-producing cells was markedly suppressed by the addition of T lymphocytes from cord blood. The suppressor activity of cord T lymphocytes seemed to be equally effective on the generation of the B cells producing three major classes, IgG, IgM, and IgA. Such suppressor activity of T lymphocytes was observed throughout infancy and gradually decreased with advancing age. At the age of 2 or later, the suppressor activity of T lymphocytes, as evaluated by co-culture with adult lymphocytes, was not consistently demonstrated. Only small number of lymphocytes in cord blood and in the peripheral blood of infants were differentiated into Ig-producing cells by *in vitro* PWM-stimulation. The generation of Ig-producing cells in peripheral blood lymphocytes increased with the advance of age and reached about half the adult mean at the age of 3. These results suggest that the PWM-induced B cell differentiation during the early period of life might be modulated, at least in part, by a relative excess of suppressor activity in T lymphocytes themselves.

2. Fc (IgG) receptor-bearing T lymphocytes were enumerated by rosette formation with ox erythrocytes coated by IgG fraction of rabbit antisera. Relative proportions of Fc (IgG) receptor-bearing T cells in the T cell-enriched population of cord blood and newborn infants were higher than those in later life and decreased to the healthy adult level by 3 months of age. Relative proportions of Fc (IgG) receptor-bearing T lymphocytes after 3 months of age showed no significant difference from the adult controls, but the suppressor activity of T lymphocytes was still demonstrated up to 1 year of age or later. Therefore, the relative proportion of Fc (IgG) receptor-bearing T lymphocytes did not appear to be parallel to the suppressor activity of T lymphocytes found during the infantile period, although Fc (IgG) receptor-bearing T cells from adult peripheral blood had been showed to suppress the differentiation of B cells into Ig-producing cells in the PWM-stimulated cultures.