

ヒト末梢血Tリンパ球のsubpopulation-2-early及びlate
Eロゼット形成細胞のmitogenに対する反応性とmonocyte依存性

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/2297/8658

ヒト末梢血Tリンパ球の subpopulation

〔II〕 early 及び late E ロゼット形成細胞の
mitogen に対する反応性と monocyte 依存性

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 中島博徳教授)

奥 田 則 彦

(昭和52年1月17日受付)

緒 言

著者は〔I〕編において SRBC fragments を使用して E ロゼット形成の抑制効果を検討する事により, early ロゼット形成細胞 (early RFC) は SRBC と極めて親和性の高い T リンパ球の subpopulation である事, さらに early RFC より freeze-thawing で得られた extracts が SRBC fragments の抑制効果を阻害し, late RFC, non-RFC より得られた extracts ではこのような活性がみられない事より, early RFC と late RFC の膜表面上の SRBC レセプターの間に量的ないしは質的な差が存在する事を明らかにした。

そこでさらに均一な population としての機能を明らかにする為に early 及び late RFC を末梢血より E ロゼット法にて分離し, T リンパ球の mitogen であると考えられている¹⁾²⁾¹⁴⁾ phytohemagglutinin (以下 PHA) 及び Concanavalin A (以下 Con A) に対する反応性を比較検討した。さらに mitogen に対する反応には monocyte の関与が必要であるという事実に基づいて³⁾⁴⁾, monocyte あるいは付着細胞 (Adherent cells) を除去した population とさらに monocyte を添加した場合の反応性について検討し, その依存性の程度を検討した。

実 験 方 法

1. リンパ球の分離及び SRBC の調整

既に〔I〕編において記載した方法に従って調整した。

2. 付着細胞あるいは monocyte の分離⁵⁾ (図1)

1×10^7 / ml に調整したリンパ球浮遊液 1 ml をあ

らかじめ 15% FCS を含む RPMI 1640 の 2 ml を添加しておいた 60×15 mm の組織培養用 plastic dish に加え 5% CO₂ in air の下で 37°C 90 分間インキュベートした。終了後上清を吸引して試験管に移し 200×g, 10 分間遠心後 RPMI 1640 にて 1×10^7 / ml に再浮遊し, 後の early 及び late RFC の分離に使用した。plastic dish は RPMI 1640 にてさらに 5 回洗浄吸引を繰り返した後 rubber policeman で付着細胞をプラスチック表面より剝離した。200×g, 10 分間遠心後 10% FCS, Penicillin (100 単位/ml), streptomycin (100 µg/ml) を含む RPMI 1640 にて 2×10^6 / ml に再浮遊し monocyte に富む population として実験に使用した。

3. early 及び late RFC の分離 (図1)

付着細胞を除去したリンパ球浮遊液から early RFC を分離する方法は〔I〕編において詳細に記載した。early RFC-depleted population より late RFC を分離する為の total ロゼット形成にはノイラミニダーゼで処理した SRBC を使用した⁶⁾。すなわち 10^8 程度の SRBC に対して 25 単位のノイラミニダーゼを添加し 37°C 1 時間インキュベート後 PBS で 3 回洗浄し 2×10^8 / ml に再浮遊した。このノイラミニダーゼ処理 SRBC を使用して〔I〕に記載した方法に準じて, late RFC を分離した。early 及び late RFC いずれも最終的に RPMI 1640 にて 1×10^6 / ml に調整し培養に使用した。

4. total 及び early RFC の検出方法

それぞれ〔I〕編において記載した。

5. EAC ロゼット形成細胞の検出方法⁷⁾

B リンパ球の補体レセプターを同定する為に E (ヒ

A subpopulation of human peripheral T lymphocytes〔II〕 Mitogenic responsiveness and monocyte dependency of early and late E rosette-forming cells of human peripheral blood lymphocytes Norihiko Okuda Department of Pediatrics (Director: Prof. H. Nakajima), School of Medicine, Kanazawa University.

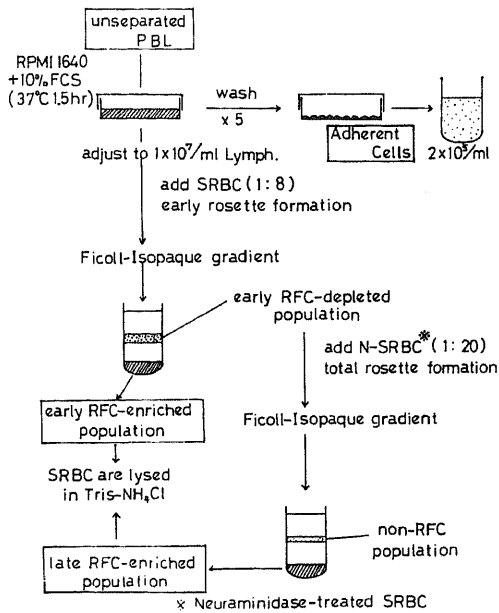


Fig. 1. Separation of Adherent Cells and Rosette-Forming Cells

ツジ赤血球) - A (抗ヒツジ赤血球家兎血清) - C (ヒト新鮮補体) ロゼット形成法を利用した。EAC の作製方法として、まず 0.15mM の CaCl_2 と 0.5mM の MgCl_2 を含む Gelatin Veronal Buffer (以下 GVB⁺) にて 1×10^9 /ml に調整した SRBC と 1000 倍に希釈した抗 SRBC 家兎血清の 19S 分画をそれぞれ 1ml づつ混合し 37°C 30 分間インキュベートして EAC を作製した。GVB⁺ にて 3 回洗浄後 1ml に再浮遊した EAC に、補体として 50 倍に希釈したヒト新鮮血清 2ml と、さらに GVB⁺ 12ml を加え 37°C で 15 分間振盪しながらインキュベートした。終了後 GVB⁺ で 3 回洗浄後 1ml に再浮遊し EAC とした。

EAC ロゼット形成細胞を検出する為に EAC とリンパ球をあらかじめ別々に 37°C 15 分間インキュベートし、その後等量に混合しさらに 37°C 30 分間インキュベートした。終了後 200×g, 5 分間遠心して静かに再浮遊させ 3 ケ以上の EAC を付着するものを陽性細胞とした。なお GVB⁺ に浮遊した未処理の SRBC を対照とした。

5. 培養方法及び ^3H -thymidine 取り込み率の測定 Streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Penicillin (100 単位/ml) 及び 10% FCS を含む RPMI 1640 培地 0.5ml 中に 1×10^5 ケのリンパ球を含むようにして培養した。添加した PHA-P 及び Con A の至適濃度はそれぞれ培養液 0.5ml あたり 0.5 μl 及び 5 μg であり実験全体を通してこの量を使用した。(図 2) monocyte の

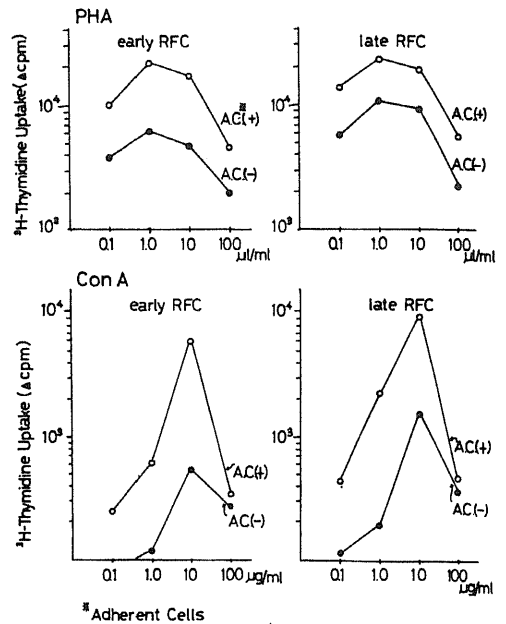


Fig. 2. Dose Response of Early and Late RFC to PHA or Con A

依存性を検討する為に 1×10^5 ケのリンパ球に対してそれぞれ 0.25, 0.5, 1, 2×10^4 の monocyte を添加し培養液全量を 0.5ml として同様に培養した。37°C, 5% CO_2 in air の条件下に 48 時間培養を行い ^3H -thymidine を 0.5 $\mu\text{Ci}/0.5\text{ml}$ 添加後さらに 24 時間培養した。終了後 Glass filter に吸引し 5% トリクロール酢酸にて固定後トルエンシンチレーターを加え液体シンチレーションカウンターにて測定した。リンパ球に取り込まれた放射能活性は mitogen を含まないコントロール培養のカウント数を差し引いた値 (Δcpm) にて算出した。実験はすべて duplicate で行った。

実験結果

1. early 及び late RFC-enriched population と付着細胞の純度の検討 (表 1)

early 及び late RFC-enriched population のロゼット形成細胞はいずれも 80% 以上であった。late RFC-enriched population への early RFC の混入は 8% 以下であったのに対し、early RFC-enriched population への late RFC の混入は約 30% にみられた。EAC 陽性細胞はいずれも 5% 以下であった。またペルオキシダーゼ反応及び形態学的にみて monocyte の混入はいずれも 0.5% 以下であった。付着細胞中に

は monocyte の比率は80-84%で10-15%にリンパ球の混入がみられた。しかし 2×10^4 の付着細胞を、PHA, Con A 添加の下に培養しても ^3H -thymidine の取り込みはほとんど無視し得る程度のものであった。

2. early 及び late RFC の PHA, Con A に対する反応性の比較検討と monocyte 依存性

1) PHA に対する反応性 (表2)

monocyte を除去した時、この2つの population の間には有意の差はみられず未分画末梢リンパ球の約1/2の ^3H -thymidine の取り込みを示した。また monocyte の添加により反応性は徐々に回復し20%の monocyte 添加により未分画末梢リンパ球の反応性とほぼ等しくなった。

2) Con A に対する反応性 (表3)

Table 1 Characteristics of Lymphocyte Subpopulations

(n = 3)	early RFC % (mean \pm s.d.)	total RFC % (mean \pm s.d.)	EAC RFC % (mean \pm s.d.)	monocyte %	PMN %
P.B.L.	31.0 \pm 5.3	68.7 \pm 3.1	29.7 \pm 0.5	9 ~ 19	3 ~ 5
P.B.L. AC*(-)	32.6 \pm 3.6	70.7 \pm 1.2	18.0 \pm 1.2	1	1 ~ 2
early RFC	56.0 \pm 3.7	88.7 \pm 3.4	5.0 \pm 1.6	< 0.5	0.5 ~ 2
late RFC	8.0 \pm 1.4	80.3 \pm 0.5	2.7 \pm 1.2	< 0.5	< 0.5
adherent cells				80 ~ 84	4

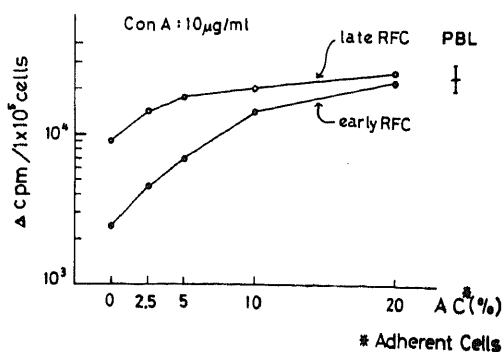
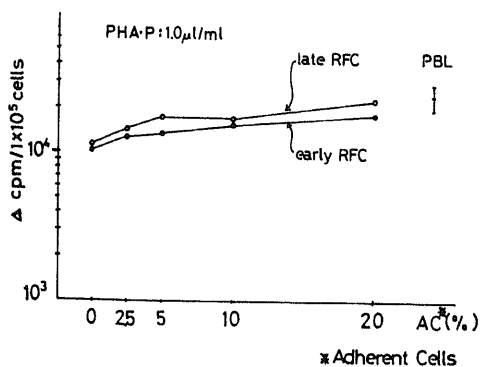
* Adherent Cells

Table 2 Mitogenic Response of Early RFC and Late RFC to PHA

Adherent Cells (%)	early RFC (n=5)	late RFC (n=5)	P value
	(mean \pm s.d. Δ cpm)		
0	10,578 \pm 2,862	11,611 \pm 2,231	n.s.
2.5	13,097 \pm 4,016	14,423 \pm 3,929	n.s.
5	13,253 \pm 1,337	17,478 \pm 4,768	n.s.
10	15,492 \pm 1,827	17,072 \pm 5,870	n.s.
20	18,596 \pm 2,876	23,703 \pm 7,554	n.s.
unseparated PBL (1×10^6)	24,571 \pm 4,529		
adherent cells (2×10^6)	146 \pm 82		

Table 3 Mitogenic Response of Early RFC and Late RFC to Con A

Adherent Cells (%)	early RFC (n=5)	late RFC (n=5)	P value
	(mean \pm s.d. Δ cpm)		
0	2,636 \pm 707	8,962 \pm 3,988	< 0.02
2.5	4,566 \pm 1,664	13,898 \pm 5,188	< 0.01
5	7,017 \pm 1,727	17,059 \pm 5,366	< 0.01
10	13,047 \pm 1,741	19,148 \pm 4,978	< 0.05
20	20,126 \pm 1,851	23,655 \pm 4,754	n.s.
unseparated PBL (1×10^6)	23,060 \pm 3,934		
adherent cells (2×10^6)	271 \pm 125		



monocyte を除去した early 及び late RFC の Con A に対する反応には著明な差がみられ、同数の未分画末梢リンパ球の反応性と比較すると early RFC 11%, late RFC 39%で、early RFC は late RFC の約1/3の反応性しか示さなかった。また20% monocyte を添加することにより反応性は著しく回復しこの2つの population の間にはほとんど有意の差がみられなくなり未分画末梢リンパ球の反応性とほぼ等しくなった。すなわち monocyte 添加により early RFC の ^3H -Thymidine の取り込みは約8倍、late RFC は約2.5倍にその反応性を回復した。

考 按

近年マウスの末梢Tリンパ球の heterogeneity に関する研究が進展し現在2つの subset が存在すると考えられている^{8)~10)}。すなわちマウスTリンパ球の特異抗原と考えられる θ 抗原量の多いものを T_1 、少ないものを T_2 とし前者は主として胸腺、脾臓にみられるのに対して、後者はリンパ腺、末梢血中に主として存在し抗胸腺血清に感受性が高く、長い life span を有するものとして Canthor らが報告した¹¹⁾¹²⁾。さらに Dutton らはこの2つの subset の Con A, PHA に対する反応性を検討し T_1 は PHA, Con A に強く反応するのに対して、 T_2 は主として Con A に反応する population であるとし¹³⁾、Stobo らもほぼ同様の成績を報告した^{14)~16)}。このように θ 抗原量、局在性、life span、抗胸腺血清に対する感受性さらに mitogen に対する反応性の差異から、マウスTリンパ球には2つの subset が存在する事が明らかにされつつあると言えよう。

ヒト末梢Tリンパ球にもこのような heterogeneity が存在する可能性は十分に考えられる所であるが、マウスTリンパ球における θ 抗原のような特異抗原が確認されていない事、さらにその為に均一な population としての分離が困難な事などが subpopulation の説明を遅らせる原因の1つであろうと考えられる。しかし、著者は SRBC fragments を使用してEロゼット形成に及ぼす抑制効果を検討する事により、ヒト末梢Tリンパ球には SRBC と極めて親和性の高い early RFC と比較的親和性が低いと考えられる late RFC の2つの subpopulation が存在し、さらにそれらのリンパ球膜表面上の SRBC レセプターの性状にも何らかの差異が存在する可能性を示唆してきた。

そこで、さらに mitogen に対する反応性を比較検討する為に付着細胞を除去した後ロゼット形成による比重遠心法を利用して分離した2つの population の

反応性、さらに monocyte を添加した場合の反応性について検討した。その結果、monocyte をほぼ完全に除去した場合 PHA に対する反応性は early 及び late RFC の間で全く差異がみられなかったのに対して、Con A に対する反応性は early RFC で有意に低下していた。さらに20%の monocyte の添加により early 及び late RFC の PHA, Con A に対する反応性は著しく回復し未分画末梢リンパ球のそれとほぼ等しくなった。ここでいくつかの問題点がみられる。1つは early 及び late RFC の PHA, Con A に対する反応性の至適濃度に差がみられないかという疑問であろう。しかし、図2に示したようにいずれの population も monocyte の混入の如何にかかわらず PHA 0.5 μl /0.5ml, Con A 5 μg /0.5ml でその反応がピークを示す事より mitogen による影響はまず除外しても差し支えないものと思われる。いま1つはそれぞれの population の純度の問題であろう。late RFC への early RFC の混入が8%以下で比較的純粋であるのに対して、early RFC には約30%の late RFC の混入がみられる。これは early RFC の分離操作の際に SRBC を 0.83% NH_4Cl -トリス緩衝液で溶血させる為 SRBC ghost あるいは fragments が残存し early RFC に付着する為にみかけ上、early RFC の比率が低く算出されたという可能性も否定できない。また early RFC はかなり厳密な条件下でのみ検出し得るという極めて不安定な方法である為に¹⁷⁾¹⁸⁾、比重遠心法の操作中に late RFC の一部もロゼットを形成する事から混入の比率が多くなるものとも考えられる。しかし Con A に対する反応性が、early RFC に極めて低いという事実を考慮した場合、もしこの population から late RFC をさらに除去し、より純粋な population とし得るならば Con A に対する反応性はさらに低くなり2つの population の Con A に対する反応性の差界がより著明になると考える事が出来よう。もう1つの重要な点はそれぞれの population への monocyte の混入の程度である。PHA, Con A に対するリンパ球の反応に monocyte が重要な役割を演ずるという事実より³⁾⁴⁾、この実験結果の差は monocyte の混入の差によるものだと解釈が成立するであろう。しかし、同一条件下で分離を行いまいづれの population も monocyte の混入が0.5%以下である点から若干の混入はみられるにしてもその混入の比率にはほとんど差はないものと考えられる。これらの点より Con A に対する反応性の差はリンパ球自体の本質的な差と考える事が出来よう。ところで、種々の mitogen あるいは特異抗原の刺

激によるリンパ球の反応に monocyte がいかなる形で関与しているか興味深い所であろう。1つはリンパ球の混合培養における monocyte の役割である^{19)~21)}。この際リンパ球と monocyte の間に組織適合性が必要であるとする説がみられるが²²⁾、多くはこの反応における monocyte の絶対的な必要性を強調している。また PHA や Con A などの mitogen に対するリンパ球の反応に monocyte がいかなる役割を演ずるかについてはなおさまざまな報告がみられる。すなわち monocyte に非依存性であるとする説²³⁾、貪食細胞が逆に PHA に対するリンパ球の反応性を抑制するとするもの²⁴⁾、また PHA の至適濃度以下の低濃度で monocyte の関与が最も必要であるとする考え方²⁵⁾などがみられる。しかしながら、nylon wool column を通すと PHA の反応が著しく低下するのに対して monocyte を添加する事によりその反応性が十分回復する事より monocyte がこの反応に必須とする説が多い³⁾⁶⁾²⁶⁾²⁷⁾。Rosenstreich らも PHA, Con A に対して monocyte の関与は絶対的に必要であり、0.3%以下になるとその反応はほとんどみられなくなるとし、これ迄に報告されてきた様々の混乱したデータは monocyte の除去の方法に問題があると述べている²⁸⁾。著者の実験で early 及び late RFC に monocyte を添加し PHA で刺激した時その反応性に全く差異がみられなかったのに対し、Con A で刺激した場合 early RFC は monocyte を添加する事によりその反応性は約8倍に増幅し、late RFC では約2.5倍にすぎなかった。この事は early RFC の方がより monocyte 依存性が強い事を意味しているものと考えられる。

ところで Woody ら²⁹⁾は抗胸腺血清でヒトTリンパ球を処理すると Con A に対する反応性を抑制する事から Con A に反応するTリンパ球は抗胸腺血清に感受性が強いとし、Owen ら³⁰⁾も抗胸腺血清処理によりヒト末梢Tリンパ球の Con A に対する反応性が抑制される事、また PHA に対する反応性を変化させないという事実より Con A と PHA に反応するTリンパ球の population が異なる事を報告している。さらに家兎の末梢リンパ球においても抗家兎ヤギ血清に感受性の高いものが Con A によく反応するという報告³¹⁾、またマウスの胸腺細胞で θ 抗原の多いものが Con A によく反応し PHA の反応性が弱いのに対し、分化して θ 抗原量が少なくなるにつれ PHA の反応性が次第に回復してくるという説もみられる¹⁵⁾。またヒトの免疫不全症の一部において PHA によく反応しながら Con A に対する反応が選択的に低下している症例、逆に PHA の反応性のみが低下しているという症

例も報告されている³²⁾。また Con A はTリンパ球のより未熟な population を刺激するという報告もみられる³³⁾。例数が少ない為実験結果の項で記載しなかったが、ヒトの胸腺細胞について同様の実験を行った所 monocyte の混入が0.1%以下の胸腺細胞(1×10^5)を PHA で刺激した時の³H-thymidine の取り込みが $\Delta 527 \pm 129$ cpm, Con A では $\Delta 316 \pm 62$ cpmであったの対し20%の monocyte を添加するとそれぞれ反応が $\Delta 17446 \pm 4430$, $\Delta 7609 \pm 2083$ と反応の回復がみられた。しかし PHA に対する反応はほぼ未分画末梢リンパ球と類似するのに対して Con A の反応性の十分な回復は得られなかった。

このような文献的あるいは実験的な事実から PHA, Con A はTリンパ球の異なった subpopulation を刺激している可能性のある事は十分考えられるであろう。

以上から、ヒト末梢Tリンパ球には early 及び late RFC が存在し、それぞれの population の PHA に対する反応性には差はみられないが、monocyte を除去すると early RFC の Con A に対する反応性が著しく低下する事、さらに20% monocyte 添加により反応性が十分回復する事より、early RFC は Con A に対する反応性を異にするTリンパ球の subpopulation であり、monocyte に対して、より依存性が強いものと考えられる。

結 論

early 及び late RFC を末梢血より分離し、さらに monocyte を除去した時の Phytohemagglutinin (PHA), Concanavalin A (Con A) に対する反応性と monocyte を段階的に加えた後の反応性について比較検討し次のような結果を得た。

1. 分離した early 及び late RFC の純度は late RFC への early RFC の混入は8%以下、early RFC への late RFC の混入は約30%であった。また monocyte の混入はいずれも0.5%以下であった。

2. early 及び late RFC の PHA に対する反応性は monocyte の除去及び添加にかかわらず有意差がみられなかった。Con A に対する反応性は monocyte を除去した時 early RFC で有意に低下し20% monocyte 添加により late RFC とほぼ同様の反応性を示した。

この結果、early RFC と late RFC は Con A に対する反応性と monocyte 依存性を異にするTリンパ球の subpopulation と考えられる。

稿を終るにあたり御指導と御校閲を賜りました恩師中島博徳教授に深く感謝の意を表します。また終始御指導を得ました谷口昂助教授に深謝致します。また多大な御協力をいただきました森谷直樹、宮脇利男両医員、並びに教室諸兄に感謝いたします。

なお本研究の一部は厚生省「免疫不全調査研究班」研究費によった。

References

- 1) Nowell, P. C. : *Cancer Res.* 20, 462 (1960).
- 2) Janossy, G. et al. : *Clin. Exp. Immunol.* 10, 525 (1972).
- 3) Levis, W. R. et al. : *Exp. Cell Res.* 61, 153 (1970).
- 4) Hersh, E. M. et al. : *J. Immunol.* 100, 1184 (1968).
- 5) Koller, C. A. et al. : *J. Immunol.* 111, 1610 (1973).
- 6) Schmidtke, J. R. et al. : *J. Immunol.* 116, 357 (1976).
- 7) T. Okuda. et al. : *Japan. J. Exp. Med.* 44, 531 (1974).
- 8) Bach, J. F. et al. : *Cell. Immunol.* 3, 11 (1972).
- 9) Kappler, J. W. et al. : *J. Immunol.* 113, 27 (1974).
- 10) Araneo, B. A. et al. : *J. Immunol.* 114, 747 (1975).
- 11) Canthor, H. et al. : *J. Exp. Med.* 131, 223 (1970).
- 12) Canthor, H. et al. : *J. Exp. Med.* 135, 1059 (1972).
- 13) Dutton, R. W. : *J. Exp. Med.* 138, 1496 (1973).
- 14) Stobo, J. D. et al. : *J. Immunol.* 108, 1 (1972).
- 15) Stobo, J. D. et al. : *Cell. Immunol.* 4, 367 (1972).
- 16) Stobo, J. D. et al. : *J. Immunol.* 110, 362 (1973).
- 17) Woody, J. N. : *J. Immunol. Methods* 8, 331 (1975).
- 18) Chisholm, R. H. et al. : *J. Immunol.* 116, 1397 (1976).
- 19) Revis, W. R. et al. : *Transplantation* 9, 515 (1970).
- 20) Twomey, J. J. et al. : *J. Immunol.* 104, 845 (1970).
- 21) Alter, B. J. et al. : *Cell. Immunol.* 1, 207 (1970).
- 22) Rosenthal, A. S. et al. : *J. Exp. Med.* 138, 1194 (1973).
- 23) Waldron, J. A. et al. : *J. Immunol.* 112, 746 (1974).
- 24) Walker, R. I. et al. : *Exp. Cell Res.* 38, 379 (1965).
- 25) Oppenheim, J. J. et al. : *J. Immunol.* 101, 262 (1968).
- 26) Wilson, D. B. et al. : *J. Exp. Zool.* 162, 161 (1966).
- 27) Lohrman, H. P. et al. : *J. Exp. Med.* 139, 1553 (1974).
- 28) Rosenstreich, D. L. et al. : *J. Immunol.* 116, 131 (1976).
- 29) Woody, J. N. et al. : *J. Clin. Invest.* 55, 956 (1975).
- 30) Owen, F. L. et al. : *J. Immunol.* 113, 1128 (1974).
- 31) Fanger, M. W. et al. : *J. Immunol.* 112, 1971 (1974).
- 32) Schiff, R. I. et al. : *J. Immunol.* 112, 376 (1974).
- 33) Cohen, H. et al. : *J. Immunol.* 105, 1146 (1970).

Abstract

After removal of monocytes by the attachment to the plastic surface of tissue culture dishes, early RFC-enriched and late RFC-enriched populations were separated from human peripheral blood lymphocytes by E-rosette sedimentation procedure. These two cell populations were compared with each other on the responsiveness to PHA-P or ConA and monocyte dependency of these responses.

1) Early RFC-enriched and late RFC-enriched populations were composed of 80% or more E rosette-forming cells. Early RFC-enriched population was contaminated with about 30% of late RFC. Late RFC-enriched population was contaminated with less than 8% of early RFC. These two cell populations contained 5% or less EAC rosette-forming cells and less than 0.5% of monocytes as judged by stained morphology and peroxidase reaction. Adherent cell preparation was composed of 80-84% monocytes and 10-15% lymphocytes. However, the response of adherent cell population (2×10^4 cells) alone to PHA-P or ConA was negligible.

2) There was no significant difference in the response to PHA-P between early RFC-enriched and late RFC-enriched population either in the presence or in the absence of additional autologous monocytes. The response of early RFC-enriched population to ConA was significantly poor as compared with that of late RFC-enriched population in the absence of additional monocytes. However, in the presence of 20% monocytes, the ConA induced proliferation of early RFC-enriched population was markedly enhanced and reached close to that of late RFC-enriched population or unfractionated peripheral blood lymphocytes.

These results suggest that early RFC may differ from the late RFC in their responsiveness and in their monocyte dependency on the stimulation with ConA.
