

新生児リンパ球機能の特性。原発性 免疫不全症早期スクリーニングのた めの基礎資料として

矢 田 純 一
四 宮 範 明
(東京医科歯科大学小児科)

目 的

新生児期には生理的に成人とは異なった免疫機能を示す。原発性免疫不全症の診断のための検査を行う際、幼若乳児を対象とする場合は、対照となる年令の健康児がどのような免疫機能の特性を有しているかを知っていないと評価ができない。その意味で健康新生児リンパ球の機能特性の検討を行い、免疫不全症を低年令でスクリーニングするための基礎資料をえようとした。

方 法

臍帯血リンパ球を用いて検索した。これまでの研究から、新生児のT細胞は成人リンパ球からの免疫グロブリン産生を抑制し、サブレッサー活性が増強していることを明らかにしてきたが、そのサブレッサーT細胞の特性についての検討を中心に行った。

成熟T細胞は OKT4 抗原をもつものと OKT8 抗原をもつものとに大別され、一般に前者にヘルパー/インデューサーが後者にサブレッサー/キラーが含まれるとされている。臍帯血リンパ球からT細胞をヒツジ赤血球とロゼットを作るリンパ球として比重遠心法で単離し、OKT4、OKT8 各々の抗原に対するマウスのモノクローナル抗体と反応させた後、抗マウスIgG 蛍光標識抗体で染色した。蛍光顕微鏡下に観察し表面蛍光陽性細胞数を算定して、OKT4、OKT8 抗原陽性T細胞の百分率を求めた。

臍帯血T細胞のサブレッサー活性をみるには成人B細胞群とT細胞の組み合わせを pokeweed mitogen で刺激し7日間培養後に出現してくる免疫グロブリン産生細胞を算定し、その系に臍帯血T細胞を加えたことによって免疫グロブリン産生細胞がどの程度減少するかを調べた。免疫グロブリン産生細胞は、培養細胞の塗抹標本を抗ヒト免疫グロブリン蛍光抗体で染色し原形質蛍光陽性細胞として検出した。

T_G 細胞 (IgG の Fc に対するレセプターをもつT細胞) と T_M 細胞 (IgM の Fc に対するレセプターをもつT細胞) とは、T_G 細胞がテオフィリン処理によってヒツジ赤血球とのロ

ゼット形成性を失うことを利用し、T細胞を4 mM テオフィリンで37°C 2時間処理後ヒッジ赤血球とロゼットを形成させた後、比重遠心によりロゼットを形成しないT_G細胞とロゼットを形成するT_M細胞とに分離した。

T細胞表面にはある種の糖脂質抗原が表出されているが、その種類とT細胞の機能との間に相関があることが示唆されている。牛脳から抽出したGM₁とGA₁、ヒト赤血球から抽出したgloboside、ヤギ赤血球から抽出したForssman抗原それぞれをウサギに免疫しそれぞれに対する抗血清を作製した。単離したT細胞にこれらの抗血清を反応させ、ついで抗ウサギ免疫グロブリン蛍光抗体を反応させて蛍光顕微鏡下に観察、表面に蛍光を発する細胞の百分率を算定した。

また、これらの糖脂質抗原を保持するT細胞を除去する目的で、T細胞にそれぞれの抗血清を室温30分反応させた後ウサギ新鮮血清（補体）を37°C30分作用させた。

concanavalin AでT細胞を刺激するとサプレッサーが誘導される。T細胞にconcanavalin Aを10 µg/mlに加え37°C48時間培養した。このような方法で成人T細胞および臍帯血T細胞からサプレッサーの誘導を行った。

deoxyguanosineはサプレッサーT細胞の機能発現を阻害する作用が知られている。成人B細胞T細胞の組み合わせからPWM刺激によって出現してくる免疫グロブリン産生細胞は臍帯血T細胞やconcanavalin Aで処理したT細胞によってその出現が抑制されるのであるが、その反応系にdeoxyguanosineを10~50 µMの濃度に加えて影響を調べた。

臍帯血B細胞の免疫グロブリン産生細胞への分化能は低下していて、成人T細胞で補助しpokeweed mitogenで刺激しても免疫グロブリン産生細胞はわずかしき出現してこない。このことがB細胞がまったく未成熟であることによるのか、ある程度成熟しているが十分に分化を遂げていないためによるのかを知るために、B細胞の分化を誘導する作用のあるlipopolysaccharide (LPS)で刺激して検討した。臍帯血B細胞群(non T細胞)にLPS 50 µg/mlを加え37°C30分培養後成人T細胞を加えてPWM 10 µg/mlで刺激、7日間培養して出現してきたIgG産生細胞数、IgM産生細胞数を算定し、LPS非刺激時のものと比較した。IgGおよびIgM産生細胞は細胞塗抹標本を抗ヒトIgGないしIgM蛍光抗体で染色し蛍光顕微鏡下に原形質蛍光陽性細胞として検出した。

結 果 と 考 察

T_G細胞はそのFcレセプターに免疫複合体が結合すると免疫グロブリン産生に対するサプレッサーとしての機能を発揮する。臍帯血T細胞のサプレッサー活性がこのようなT_G細胞の作用によるものかそれともT_M細胞中のサプレッサーの活性化によるものかを調べるために、臍帯血T細胞をT_G細胞とT_{nonG}細胞とに分けて成人リンパ球に添加しPWM刺激による成人リンパ球からの免疫グロブリン産生細胞の出現がどちらのT細胞亜群によって抑制されるかをみた成績が図1である。T_G細胞はほとんど抑制活性を示さなかったのに反し、T_{nonG}細

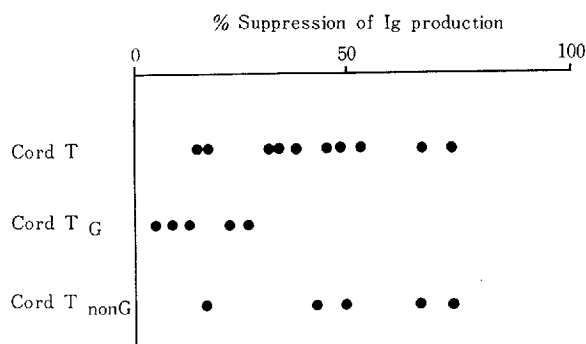


図1 Suppressor activity of cord T_G and T_{nonG} cells on immunoglobulin production from PWM stimulated adult lymphocytes

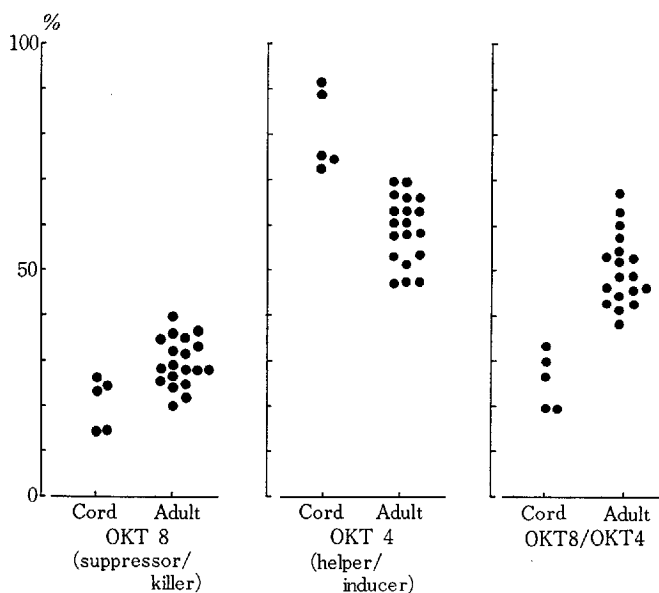


図2 Percentages of OKT antigen positive T-cells of cord blood

胞は未分離のT細胞と同等の抑制作用を示した。このことから臍帯血T細胞にみられるサプレッサー作用は T_M 細胞に存在するものと考えられた。

ヒトT細胞は OKT4 抗原をもつものと OKT8 抗原をもつものとに分けられるが、サプレッサーは通常 OKT8 陽性のものに存在するといわれる。しかし OKT4 陽性のものの中にもサプレッサー活性を示すものが存在することが知られている。臍帯血T細胞のサプレッサー活性がいずれのT細胞亜群の関与によるものかを予測するために、T細胞中の OKT4 抗原陽性のものと OKT8 抗原陽性のものとの比率を調べた成績が図2である。成人T細胞に比して通常のサプレッサーが含まれる OKT8 抗原陽性のものはむしろ少なく、OKT4 抗原陽性のもの

表1 Percentages of T cells bearing detectable glycolipids

Glycolipids	Adult T cells	Cord T cells
GM1	2.5±1.1%	4.0±1.6%
GA1	1.2±0.4	8.8±1.3
Forssman	2.6±1.3	2.6±1.1
Glogoside	2.0±0.9	6.8±0.8

が増加していた。したがって、臍帯血T細胞のサプレッサー活性はむしろ OKT4 抗原陽性のものに存在することが予想された。

次に、ある種の糖脂質抗原の細胞膜への表出とそのリンパ球の機能的亜群との相関を予想して、GM1, GA1, Forssman, globoside それぞれの抗原を表現しているT細胞の比率を細胞膜免疫蛍光法で検出することにより求めた。成人T細胞と臍帯血T細胞の間で GM1 陽性のものと Forssman 抗原陽性のものとはその数に相違をほとんどみとめなかったが、GA1 抗原陽性のものと globoside 抗原陽性のものとは臍帯血T細胞で明らかに増加していた(表1)。これらの臍帯血T細胞中で増加している糖脂質抗原陽性のものとサプレッサー機能との相関を求めするため、T細胞を各々の抗糖脂質抗原抗体と補体とで処理し、特定の糖脂質抗原をもつT細胞を除去した上でサプレッサー活性を調べた。抗 GM1 と抗体あるいは抗 Forssman 抗体で処理した場合は臍帯血T細胞のサプレッサー活性はほとんど影響をうけなかったが、抗 GA1 抗体および抗 globoside 抗体で処理するとサプレッサー活性は完全に除去された(図3)。したがって臍帯血T細胞のサプレッサー活性は GA1 抗原および globoside 抗原をもつT細胞に存在するものと考えられた。これらの抗原をもつT細胞は数の上でも臍帯血T細胞で増加していたわけであり、サプレッサー活性の発現にこれらのT細胞の増加が関係しているであろうとした先の予測が正しいことを示していよう。

deoxyguanosine は比較的選択的にサプレッサーT細胞の発現を阻害するといわれる。臍帯血T細胞のサプレッサー活性が通常のサプレッサーと同様に deoxyguanosine に感受性があるか否かを検討した。10 $\mu\text{M}/\text{ml}$ の濃度の deoxyguanosine の存在ではあまりサプレッサー活性の変化をみとめなかったが20 $\mu\text{M}/\text{ml}$ ではサプレッサー活性が減弱し、50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ では完全に解除された(図4)。したがって臍帯血T細胞で観察されるサプレッサーの増強は deoxyguanosine に感受性のあるサプレッサーT細胞の活性化によると考えられた。

concanavalin A はT細胞からサプレッサーT細胞機能を誘導する作用がある。臍帯血T細胞のサプレッサー活性と concanavalin A で誘導されるサプレッサーT細胞活性との関係をみるため、臍帯血T細胞を concanavalin A 存在下に48時間培養してそのサプレッサー活性を調べた。成人T細胞ではこのような条件下で強いサプレッサー能が誘導されたが、臍帯血T細胞ではほとんどサプレッサー活性の出現をみとめなかった(図5)。したがって、臍帯血T細胞にみとめられるサプレッサー能は concanavalin A で誘導されるものと異質のものであると考

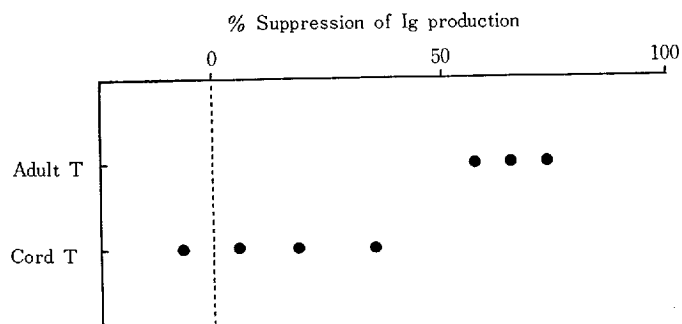


図5 Con A induced suppressor activity of cord T cells on immunoglobulin production

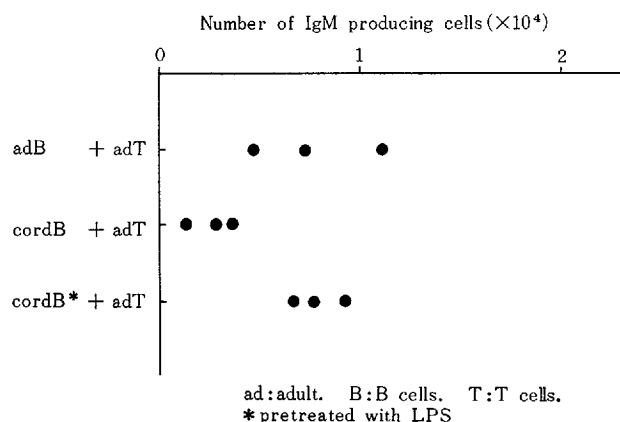
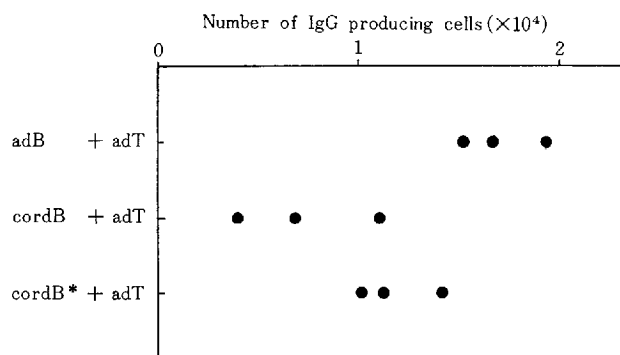


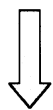
図6 Effect of LPS treatment of B cells on their PWM induced differentiation to IgG or IgM producing cells

リンパ球中のB細胞数は臍帯血のものは成人のものと比較してさほど変わらないが、臍帯血B細胞からの免疫グロブリン産生細胞の出現はきわめて不良である。このようなB細胞の未成熟性がどの程度のものであるかを知るため、臍帯血B細胞を Lipopolysaccharide (LPS) で刺激

して48時間培養した後、免疫グロブリン産生細胞への分化度を調べた。LPS 処理によって臍帯血B細胞からは成人B細胞に匹敵するだけの IgM 産生細胞が出現するようになった。IgG 産生細胞はあまり増加しなかったが、LPS 未処理のものに比しいくぶんの増加をみた(図6)。これらのことは LPS によって臍帯血B細胞が成熟したことを示しており、臍帯血のB細胞はまったく未成熟であるというわけではなく、ある程度分化の準備状態の段階にあると考えられた。

要 約

臍帯血T細胞は免疫グロブリン産生系に対して強いサプレッサー活性を有している。このサプレッサー活性は T_a 細胞以外のT細胞画分に存在し、また通常のサプレッサーT細胞と異なり OKT4 抗原をもつT細胞であることが予想された。さらに、臍帯血で増強しているサプレッサーT細胞は糖脂質抗原のうち GA1 抗原と globoside 抗原をもつT細胞と考えられ、これらの糖脂質抗原をもつT細胞は数の上でも増加していた。またこのサプレッサーT細胞は deoxy-guanosine でその発現が阻止される性質のものであった。そして concanavalin A で誘導されるサプレッサーT細胞とは異なるものと考えられた。臍帯血B細胞はそのままでは pokeweed mitogen で刺激してもあまり免疫グロブリン産生細胞に分化しないが Lipopolysaccharide で刺激しておくとなんかの分化を示し、未熟ではあるが成熟の準備段階にあると考えられた。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約

臍帯血 T 細胞は免疫グロブリン産生系に対して強いサプレッサー活性を有している。このサプレッサー活性は TG 細胞以外の T 細胞画分に存在し、また通常のサプレッサー T 細胞と異なり OKT4 抗原をもつ T 細胞であることが予想された。さらに、臍帯血で増強しているサプレッサー T 細胞は糖脂質抗原のうち GA1 抗原と globoside 抗原をもつ T 細胞と考えられ、これらの糖脂質抗原をもつ T 細胞は数の上でも増加していた。またこのサプレッサー T 細胞は deoxy-guanosine でその発現が阻止される性質のものであった。そして concanavalin A で誘導されるサプレッサー T 細胞とは異なるものと考えられた。臍帯血 B 細胞はそのままでは pokeweed mitogen で刺激してもあまり免疫グロブリン産生細胞に分化しないが Lipopolysaccharide で刺激しておくとかかなりの分化を示し、未熟ではあるが成熟の準備段階にあると考えられた。